

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

**Die Reduktion des Nachhyperpolarisationspotenzials
nach einer Abfolge von Aktionspotenzialen in der CA1
Region im akuten Epilepsiemodell der Ratte**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Karoline Kernig, geb. am 27.10.1985 in Rostock

Rostock, Juli 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

Universitätsmedizin Rostock
Oscar Langendorff Institut für Physiologie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree

Universitätsmedizin Rostock
Institut für Anatomie

3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heiko Luhmann

Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Institut für Physiologie

Tag der Einreichung: 12. Juli 2014

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29. April 2015

Meinen lieben Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	5
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
3	EINLEITUNG	11
3.1	Epilepsie und Temporallappenepilepsie.....	11
3.2	Epileptiforme Aktivität im Hippokampus.....	14
3.3	Gabazin als Induktor akuter epileptiformer Aktivität	17
3.4	Aktionspotenziale und Nachhyperpolarisationspotenzial	18
3.5	SK-Kanäle als Ca^{2+} - aktivierte Kaliumkänale.....	20
3.5.1	<i>Kanaltypen</i>	<i>20</i>
3.5.2	<i>Kanalstruktur von SK-Kanälen</i>	<i>21</i>
3.5.3	<i>Vorkommen von SK-Kanälen</i>	<i>22</i>
3.5.4	<i>Pharmakologie von SK-Kanälen.....</i>	<i>22</i>
3.5.5	<i>Aktivierung von SK-Kanälen.....</i>	<i>23</i>
3.6	Zielstellung	24
4	MATERIAL UND METHODEN.....	25
4.1	Material.....	25
4.1.1	<i>Geräte zur elektrophysiologischen Messung.....</i>	<i>25</i>
4.1.1.1	Geräte zur Präparation hippokampaler Schnitte	25
4.1.1.2	Geräte zur elektrophysiologischen Ableitung	27
4.1.1.3	Weiteres Labormaterial.....	28
4.1.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>29</i>

4.1.2.1	Chemikalien zur elektrophysiologischen Ableitung.....	29
4.1.2.2	Weitere Chemikalien.....	31
4.1.3	<i>Versuchstiere</i>	31
4.1.4	<i>Lösungen zur elektrophysiologischen Ableitung</i>	32
4.2	Methodik.....	33
4.2.1	<i>Versuchslösungen</i>	33
4.2.2	<i>Herstellung der Mikropipetten</i>	33
4.2.3	<i>Präparation der hippokampalen Hirnschnitte</i>	34
4.2.4	<i>Aufbau des Messplatzes und elektrophysiologische Messungen</i>	35
4.2.5	<i>Auslösung akuter epileptiformer Aktivität</i>	39
4.2.6	<i>Auswertung und Statistik</i>	41
5	ERGEBNISSE	42
5.1	Bestimmung der elektrophysiologische Eigenschaften.....	42
5.2	Gabazin-induzierte epileptiforme Aktivität.....	44
5.3	Die Unterdrückung des AHP durch epileptiforme Aktivität	46
5.4	Die Unterdrückung des AHP durch Proteinkinase Inhibition	50
6	DISKUSSION	54
6.1	Elektrophysiologische Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen	54
6.2	Generierung akuter epileptiformer Aktivität im neuronalen Netzwerk	55
6.3	Bedeutung der Hemmung von Glutamatrezeptoren im neuronalen Netzwerk	58
6.4	AHP-Suppression und die Bedeutung im neuronalen Netzwerk.....	60
6.5	Zusammenfassung	66
7	ANHANG	67

7.1	Abbildungsverzeichnis	67
7.2	Tabellenverzeichnis	67
7.3	Danksagung	68
8	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	69
9	LEBENS LAUF	70
10	THESEN	73
11	REFERENZEN	75

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
ADP	Aktionspotential-Nachdepolarisation
AHP	Aktionspotential-Nachhyperpolarisation (engl. AHP = <u>a</u> fter <u>h</u> yperpolarizing <u>p</u> otential)
AMPA	α -Amino-3-hydroxi-5-methylisoxazolpropionat
AMPA-R	AMPA-Rezeptor
A	Ampere
AUC	area under the curve
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cl ⁻	Chlorid
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-Dione
d.h.	das heißt
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
DG	Gyrus dentatus
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A R	GABA _A -Rezeptor
ggf.	gegebenenfalls
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
H-9	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride
H-89	<i>N</i> -[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride
HCl	Salzsäure
HCN	engl. = <u>h</u> yperpolarization-activated <u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide gate nonselective channel

9 Abkürzungsverzeichnis

Hz	Hertz
i.e.S.	im engeren Sinne
I_H	durch Hyperpolarisation aktivierter Einwärtsstrom
IP_3	Inositoltriphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KCNN/SK	kalziumabhängige, spannungsunabhängige Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molare Masse
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
m	Meter
m/s	Meter je Sekunde
min	Minute
MP	Membranpotenzial
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
Ω	Ohm
osmol/kg	Einheit der Osmolalität
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
pS	Pikosiemens
PKC	Proteinkinase C
R^2	Bestimmtheitsmaß
R_{in}	Eingangswiderstand
RMP	Ruhemembranpotenzial
s	Sekunde
s.	siehe

10 Abkürzungsverzeichnis

S.E.M.	engl.: standard error of the mean = Standardabweichung vom Mittelwert
SK	small conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} -Channel
sog.	sogenannt
τ	Membranzeitkonstante
u. a.	unter anderem
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

3 Einleitung

3.1 Epilepsie und Temporallappenepilepsie

Epilepsie ist die vierthäufigste neurologische Erkrankung mit einer jährlichen Inzidenz von 55/100000 Menschen in den USA und Europa. Das Lebenszeitrisko wird auf etwa 3,1% geschätzt (Sander, 2003). Der Begriff Epilepsie beschreibt nicht nur einen Zustand. Vielmehr beschreibt er eine ganze Reihe an Fehlsteuerungen, die mit einer abnorm gesteigerten Prädisposition zu Krampfanfällen einhergeht. Sie ist charakterisiert durch unvorhersehbare, spontane und wiederkehrende Unterbrechungen der normalen Hirnfunktion, die im engeren Sinne als epileptische Anfälle bezeichnet werden. Epilepsie wird erst dann als solche bezeichnet, wenn es zu mindestens einem Anfall gekommen ist, der ohne vorausgegangene Ursache eintritt. Anfallartig kommt es zu Entladungen, die sich ausgehend von einem Zentrum über das gesamte Gehirn ausbreiten, wobei der Kortex üblicherweise Ausgangspunkt der epileptischen Anfälle ist. Ursachen können vielfältiger struktureller und funktioneller Ätiologie sein (Fisher et al., 2005). In Ausprägung und Symptomatik kann dies deutlich werden durch Bewusstseinsverlust, Störungen in sensorischer, motorischer und autonomer Funktion, Kognition oder des Verhaltens.

Um international eine bessere Verständigung zu schaffen, wurde auf Grundlage der mannigfaltigen Syndrome und Ätiologien ein Klassifikationssystem generiert. Erstmalig 1981, revidiert 1989 und dann in unterschiedlichen zeitlichen Abständen wurden durch die internationale Liga gegen Epilepsie (engl. International League Against Epilepsy (ILAE)) Einteilungen erstellt, die nach Anfallstyp, Ätiologie, Lokalisation des epileptischen Areals und nach dem epileptischen Syndrom einteilte (1981; 1989; 1993). Ursachen für Epilepsien sind vielschichtig und können in jedem Lebensalter zutage treten, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter steigt (Hesdorffer et al., 2011). Diskutiert werden angeborene Ursachen, wie Gendefekte oder peri- bzw. postnatale Störungen. Weiterhin können zu jeder Zeit vaskuläre und metabolische Störungen (z.B. durch Hyponatriämie), Tumore,

Infektionen, Operationen am Gehirn und Traumata zu einer Epilepsie führen (Oxbury and Whitty, 1971) .

So vielfältig wie die Ursachen sind ebenso die verschiedenen Formen von Epilepsie. Kriterien, die eine entscheidende Rolle für die Einteilung darstellen, sind eine möglich bekannte Ätiologie, die klinische Manifestation und EEG-Befunde. Anfälle, die ihren Ursprung in einer bestimmten Region des Gehirns nehmen, werden als fokale epileptische Anfälle bezeichnet. Klinisch äußern sie sich durch das unwillkürliche, rhythmische Zucken von umschriebenen Muskelgruppen. Während einfacher partieller Anfälle berichten Patienten über psychische, olfaktorische, gustatorische und autonome Symptome (Wiebe et al., 2001). Eine Erweiterung stellen die komplex-fokalen Anfälle dar, bei denen es zusätzlich zum Bewusstseinsverlust kommt. Dem gegenüber stehen die generalisierten Anfälle. Sie sind gekennzeichnet durch die diffuse Ausbreitung des Anfalls über beide Hemisphären, was klinisch die Einbeziehung des gesamten Körpers nach sich zieht. Auch fokale Anfälle können sekundär generalisieren.

Neben fokalen und generalisierten Epilepsien werden noch unklassifizierbare Epilepsien und spezielle Syndrome unterschieden. Zu den speziellen Syndromen gehört unter anderem auch der Status epilepticus. Dieser beschreibt einen anhaltenden epileptischen Zustand oder eine Anfallsserie, ohne Wiedererlangung des Bewusstseins über einen längeren Zeitraum. Viele Autoren diskutieren hierfür eine Länge von mindestens 30 Minuten (Meldrum and Horton, 1973; Nevander et al., 1985; Bassin et al., 2002). Dieser Zeitpunkt stellt offenbar einen Wendepunkt dar, der, einmal überschritten, zu signifikanten, neuronalen Zerstörung führt. Andere Veröffentlichungen diskutieren einen generalisierten Anfall bereits nach 5 Minuten Status epilepticus zu nennen, da eine Selbstlimitierung ab diesem Zeitpunkt unwahrscheinlich ist (Theodore et al., 1994; Lowenstein et al., 1999).

Fokal-komplexe Anfälle haben ihren Ursprung am häufigsten im Temporallappen. Die Temporallappenepilepsie stellt die häufigste Form der Epilepsie im Erwachsenenalter dar und ist wesentlich mit einer Sklerosierung des Hippokampus als neuropathologisches Korrelat vergesellschaftet (Camfield and

Camfield, 1996; Engel, 2001). Diese Form der Strukturveränderung des Gehirns und nachfolgender Epilepsie wird auch als mesiale temporale Sklerose bezeichnet. Histopathologische Kennzeichen sind der segmentale Neuronenverlust in den Regionen CA1-CA4, sowie im Gyrus dentatus und eine reaktive Gliose (Blümcke et al., 2002; Blümcke et al., 2007).

Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie finden sich häufig prädisponierende Erkrankungen. Dazu gehören komplizierte Fieberkrämpfe, zerebrale Infektionen, Traumata oder Gefäßmissbildungen in den ersten vier bis fünf Lebensjahren. Danach kann sich eine anfallsfreie Latenzzeit von mehreren Jahren einstellen (French et al., 1993; Mathern et al., 1995). Weiterhin werden auch familiäre, genetische Ursachen diskutiert. Typischerweise sprechen diese epileptischen Anfälle recht gut auf eine medikamentöse Versorgung an, wohingegen die Temporallappenepilepsie weitgehend resistent gegen eine Therapie mit Antiepileptika ist (Leppik, 1992). In einer randomisierten Studie konnte belegt werden, dass Patienten mit einer gegenüber Medikamenten refraktären Epilepsie eindeutig von einer chirurgischen Intervention im Sinne einer Hippokampusresektion profitieren. Die Verminderung des absoluten Risikos eines Wiederauftretens von Krampfanfällen nach einer Operation, im Vergleich zur medikamentösen Therapie, ist ungewöhnlich hoch (Wiebe et al., 2001).

3.2 Epileptiforme Aktivität im Hippokampus

Der Hippokampus als einer der phylogenetisch ältesten Strukturen des Gehirns ist Teil des limbischen Systems. Bereits 1878 durch Broca beschrieben, konnte an den meisten Gehirnen von Säugetieren eine Struktur charakterisiert werden, die sich an der Grenze (Limbus) zum Neokortex, an der Basis des Telenzephalons abzeichnete. Das limbische System als komplexes Netzwerk kann unterteilt werden in zentrale (Archikortex) und periphere (Paraarchikortex) Anteile. Der Hippokampus gehört als Formation aus Gyrus dentatus, Ammonshorn und Subiculum zu den zentralen, ebenso wie das Indusium griseum und die Tenia tecta. Die Peripherie wird unter anderem durch das Cingulum und den entorhinalen Kortex gebildet. Obwohl zunächst angenommen wurde, dass dieses System vielmehr der Sinneswahrnehmung Riechen zuzuschreiben war, fand Papez schon 1937 heraus, dass auch Gefühls- und Affektstörung dieser Region zuzuweisen sind und durch MacLean 1952 erweitert, eine Schaltstelle zwischen somatischem und viszeralem System darstellt (Papez, 1937; MacLean, 1952).

Der Hippokampus bildet sich aus zwei C-förmigen ineinander greifenden Zellschichten. Diese werden zum einen aus dem Gyrus dentatus und andererseits aus dem Ammonshorn (Cornu ammonis) geformt. Der Gyrus dentatus berücksichtigt drei Zellschichten, das Stratum moleculare und granulosum, sowie die Hilusregion mit polymorphen Zellen. Das Ammonshorn unterteilt sich in vier verschiedene Regionen (CA1 bis CA4) mit unterschiedlichen Zellpopulationen und -funktionen. CA4 besitzt dabei die gleiche Zellform wie die Hilusregion am Gyrus dentatus und ist daher nicht eindeutig abgrenzbar. Die prominenteste Zellschicht im Cornu ammonis ist das Stratum pyramidale. Dicht gepackte, bereits lichtmikroskopisch erkennbare Zellkörper der Pyramidenzellen finden sich hier (s. Abb.3-1). Die basalen Axone der CA1-Neurone ziehen über das Stratum oriens zum Alveus und Subiculum und verlassen das Cornu ammonis. Apikale Dendriten bilden mit den Schaffer-Kollateralen der CA3-Neurone Synapsen das wenig zellreiche Stratum radiatum. Neben diesen exzitatorischen befinden sich hier auch eine Vielzahl an inhibitorischen Neuronen (Lopes da Silva et al., 1990).

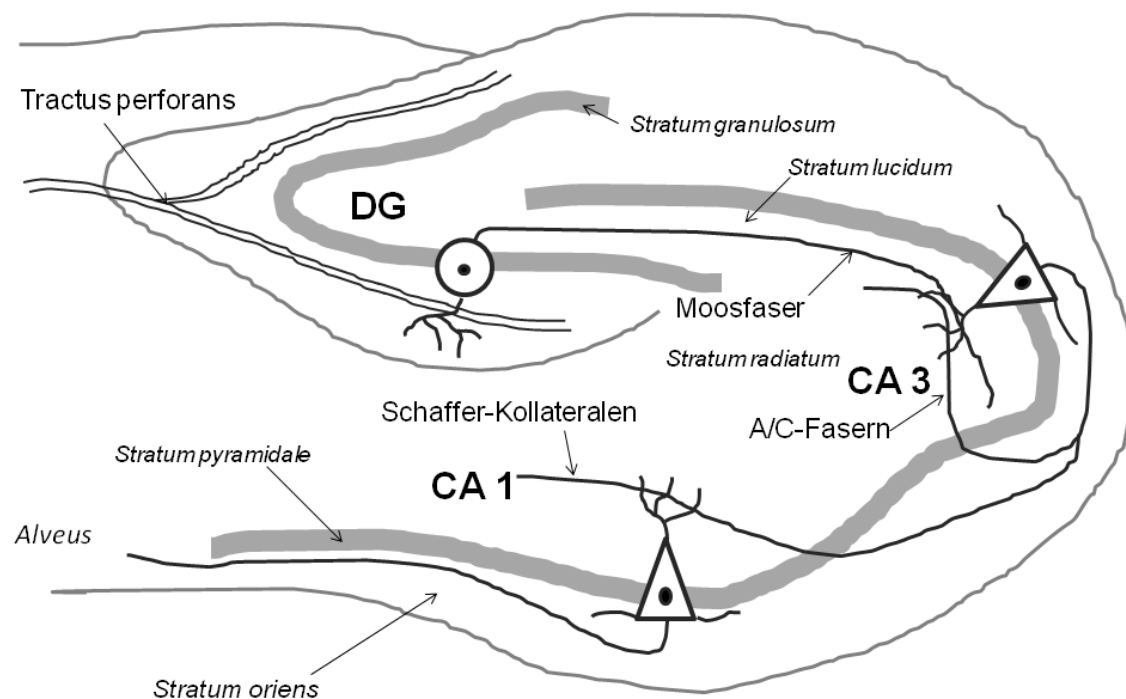


Abbildung 3-1: Hippokampus im Querschnitt (schematische Darstellung; modifiziert nach (Kirschstein, 2009))

Vereinfacht erfolgt die Informationsverarbeitung einer trisynaptischen Schleife. Die Informationen gelangen über den Tractus perforans aus der Regio entorhinalis ins Stratum moleculare, wo dieser mit den Dendriten der Körnerzellen Synapsen ausbildet. Die Körnerzellen wiederum senden ihre Axone als Moosfasern in das Stratum lucidum an apikale Dendriten von CA3 Neuronen (Claiborne et al., 1986). Daneben sind auch direkte Fasern zu CA1-Pyramidenzellen und ins Subiculum beschrieben. Die CA3-Pyramidenzellen besitzen sowohl basale Dendriten, die im Stratum radiatum als Schaffer-Kollateralen an die apikalen Dendritenbäume von CA1-Neuronen terminieren, als auch Kommissuren- und Assoziationsfasern (A/C-Fasern), die jeweils in den kontralateralen bzw. ipsilateralen Hippokampus ziehen (Amaral, 1993).

Der Hippokampus funktioniert als zentrale Schaltstelle im limbischen System. Es wird angenommen, dass anatomische, biochemische und physiologische Veränderungen der Neuronengruppen im Hippokampus die Entstehung von epileptischen Anfällen begünstigen (Walker et al., 2002). Über die Verknüpfung verschiedener Systeme führen Umbauprozesse nicht nur zu spontanen epileptischen Anfällen, sondern auch zu komplexeren Störungen. Ferner können Sinnessysteme betroffen sein, wodurch es zu Geruchs- und Geschmackssensationen kommen kann, aber auch visuellen Halluzinationen, die als Auren bezeichnet werden.

Neuronale Netzwerke zwischen den Strukturen des limbischen Systems, wie Hippokampus, Amygdala und entorhinalen Kortex, sind eng verknüpft mit der Entstehung von epileptischen Entladungen. Es werden verschiedene Aktivitäten unterschieden, wobei man ictale von interiktalen abgrenzt. Die interiktalen sind die kürzeren, zwischen den ictalen auftretenden Entladungen. Solche Ereignisse werden Spikes („Krampfspitzen“ im EEG) oder scharfe Wellen, seltener Spike und Wave Komplexe bezeichnet, die zwischen klinisch manifesten Anfällen auftreten. Unter experimentellen Bedingungen bei in vitro Epilepsiemodellen entstehen interiktale Entladungen zumeist in der CA3 Region, von wo sie direkt über die CA1 Region, zum Subiculum und in den entorhinalen Kortex geleitet werden, um dann wiederum in den Gyrus dentatus und somit wieder in den Hippokampus zu gelangen. Diese hippokampoentorhinale Schleife scheint für die Aufrechterhaltung von epileptischen Anfällen verantwortlich zu sein (Avoli et al., 2002). Im Gegensatz dazu entstehen Entladungen, welche im Anfall ictalen Ereignissen im EEG entsprechen und mehrere Sekunden bis Minuten andauern können, im in vitro Modell häufig im entorhinalen Kortex. Von dort aus können sie ins gesamte limbische System übergeleitet werden. Die schnellen interiktalen Entladungen, die in der CA3 Region generiert werden, sind offenbar mehr für die Kontrolle, als Aufrechterhaltung der ictalen, im entorhinalen Kortex entstehenden Entladungen verantwortlich (Barbarosie and Avoli, 1997).

3.3 Gabazin als Induktor akuter epileptiformer Aktivität

Neben verschiedenen etablierten Modellen zur experimentellen Erforschung der Temporallappenepilepsie in vivo existieren ebenso gut validierte Verfahren, zelluläre Mechanismen am Hippokampus nach Induktion epileptiformer Aktivität zu untersuchen. Die Induktion einer chronischen Epilepsie bietet die Möglichkeit, Strukturveränderungen während der Chronifizierung auf zellulärer Ebene zu untersuchen. So bildet sich nach einer Latenzperiode, insbesondere im Gyrus dentatus und am Übergang zwischen CA1 und Subiculum, eine typische Hippokampussklerose aus (Mathern et al., 1997). Außerdem führen Reorganisationsprozesse im Hippokampus und Parahippokampus zu Veränderungen im neuronalen Netzwerk, wie z.B. durch Moosfaseraussprossung und Interneuronenverlust. Die meisten dieser Veränderungen, die in chronischen Tiermodelle (z.B. Pilokarpinmodell) auftreten, bilden in großer Übereinstimmung jene Ereignisse dar, die auch bei Patienten mit einer Temporallappenepilepsie entstehen (Löscher, 2002; Wieser, 2004). Die oben genannten Tiermodelle stellen daher wichtige Werkzeuge in der aktuellen Forschung zur Temporallappenepilepsie dar.

Im Gegensatz zu Tiermodellen zur Erforschung chronischer Epilepsie erfassen Tiermodelle akuter epileptiformer Aktivität weniger chronische Strukturveränderungen, als vielmehr zelluläre, z.B. post-transkriptionelle, Prozesse, die nach kurzer Zeit auftreten. Ein übliches Modell zur Auslösung akuter epileptiformer Aktivität in Hirngewebeschnitten wird üblicherweise mit Bicucullin, einem GABA_A-Rezeptor Blocker, realisiert (Schwartzkroin and Prince, 1980; Williamson and Wheal, 1992; Khawaled et al., 1999). Hierdurch wird die tonische, inhibitorische Aktivität GABAerger Synapsen reduziert und führt somit zur Ausbildung akuter epileptiformer Aktivität. Seit etwa fünf Jahrzehnten ist bekannt, dass die verlängerte Erregung hippokampaler Neurone unter Hemmung der synaptischen Transmission zur Ausbildung epileptiformer Aktivität führt (Matsumoto and Ajmone Marsan, 1964; Matsumoto et al., 1969; Ayala et al., 1973). Anhaltende synaptische Erregung führt zu einer repetitiven Aktionspotenzialfolge, die als Bursts bezeichnet werden. Diese sind

gekennzeichnet durch eine prolongierte Nachhyperpolarisation (AHP=engl.: afterhyperpolarizing potential = Nachhyperpolarisationspotenzial), die auch Gegenstand unserer Untersuchungen war (Hotson and Prince, 1980). Mehrere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass Bicucullin auf das Nachhyperpolarisationspotenzial einen supprimierenden Effekt aufweist. Demzufolge ist es ungeeignet, die Auswirkung akuter Entladungen auf das AHP zu untersuchen (Johnson and Seutin, 1997; Seutin et al., 1997; Debarbieux et al., 1998; Khawaled et al., 1999). Eine Alternative zu Bicucullin zur Auslösung epileptischer Potenziale ist der GABA_A-Rezeptor-Inhibitor Gabazin (=SR95531). Eine Modifizierung des AHP durch Gabazin wird in der Literatur verneint (Seutin et al., 1997). Gabazin hemmt selektiv den GABA - induzierten Cl⁻ Strom und führt demzufolge zu einem Wegfall des hemmenden Effekts von GABA an den spezifischen Rezeptoren. Als vorteilhaft erweist sich die Tatsache, dass Gabazin, anders als z.B. bei Pentylenetetrazol (PTZ, ein weiteres Stimulans für akute Entladungen), schon bei sehr niedrigen Konzentrationen unter dem millimolaren Bereich eine aufhebende Wirkung der synaptischen Übertragung zur Folge hat, was somit kaum Auswirkung auf die Vitalität der Neuronen hat (Lappin et al., 2005).

3.4 Aktionspotenziale und Nachhyperpolarisationspotenzial

In vitro Studien haben ergeben, dass im hippokampalen Cornu Ammonis (CA1) eine verlängerte Depolarisation eine repetitive Aktionspotenzialfolge hervorruft. Hieran schließt sich eine verlängerte Hyperpolarisation an. Ob schnelle Re- bzw. Hyperpolarisationen nach Aktionspotenzialen auftreten oder nicht, bestimmt entscheidend das Erregungsniveau im neuronalen Netzwerk (Hotson and Prince, 1980; Madison and Nicoll, 1984; Storm, 1989, 1990). Das AHP beeinflusst die intrinsische Erregbarkeit der Neuronen. Weiterhin wird angenommen, dass die Geschwindigkeit und Effektivität neuronaler Prozesse, aber auch spezifischere Funktionen, wie die Transmitterfreisetzung oder repetitive Entladungen in Neuronen diesen Mechanismen unterliegen (Klein et al., 1980). Die Aktionspotenzialdauer bewirkt die Aktivierung von spannungs- bzw. Ca²⁺-

aktivierten K^+ -Kanälen. Die hierdurch bedingte Hyperpolarisation moduliert so die Erregbarkeit und Entladungsrate im Neuron. Dies legt nahe, dass das AHP bedeutend für die Beendigung von interiktalen Entladungen ist, die Überleitung vom interiktalen zum iktalen Zustand hemmt und die Reduktion verantwortlich für Epilepsie zu sein scheint (Madison and Nicoll, 1984; Storm, 1987; Alger and Williamson, 1988).

Bereits Anfang der achtziger Jahre haben verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt, dass das AHP durch einen Ca^{2+} aktivierten K^+ Strom induziert wird (Alger and Nicoll, 1980; Schwartzkroin and Stafstrom, 1980; Gustafsson and Wigström, 1981; Madison and Nicoll, 1984). Weitergehende Untersuchungen an CA1 Neuronen im Hippokampus untersuchten die dem AHP zugrundeliegenden Stromkomponenten (Baraban et al., 1985; Alger and Williamson, 1988; Alger et al., 1990; Williamson and Alger, 1990). Derzeit werden drei verschiedene Potenzialkomponenten nach ihrer Kinetik unterschieden werden. Eine schnelle (f = engl. fast), mittlere (m = engl. medium) und langsame Komponente (s = engl. slow) (Sah, 1996).

Das schnelle fAHP, welches eher das Ende der Repolarisation nach einem oder mehreren Aktionspotenzialen darstellt, bildet die initiale Komponente des AHP. Sie dauert typischerweise 10-20 ms und wird durch die Aktivierung spannungs- und Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit (=MaxiK o. BK-Kanäle, engl. big conductance) initiiert (Sah, 1996; Shao et al., 1999; Gu et al., 2007). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass das langsame sAHP, sowie mittellange mAHP durch Aktivierung unterschiedlicher Kaliumkanäle resultiert, so z.B. spannungsunabhängige Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle, HCN- und KCNQ-Kanäle (Storm, 1989; Williamson and Alger, 1990; Vogalis et al., 2003; Gu et al., 2005; Gu et al., 2007). Für die frühe Frequenzadaption einer Aktionspotenzialsalve sind das mAHP, und der ihm zugrunde liegende Strom I_{AHP} , verantwortlich; es dauert etwa 50-200 ms. Eine noch längere Latenz weist das sAHP (sI_{AHP}) auf. Es kann bis zu mehreren Sekunden anhalten und vermittelt die späte Frequenzadaption. Das mAHP aktiviert schnell und klingt dann über mehrere hundert Millisekunden ab. Das sAHP ist gekennzeichnet durch einen langsameren Anstieg über mehrere hundert Millisekunden und hält bis zu

mehreren Sekunden an (Madison and Nicoll, 1984; Storm, 1990; Sah, 1996; Stocker and Pedarzani, 2000; Gu et al., 2005). Beide AHP werden im Wesentlichen durch auswärtsgerichtete K^+ -Ströme hervorgerufen, die wiederum durch einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} aktiviert werden (Blatz and Magleby, 1986; Lancaster and Nicoll, 1987; Sah, 1996; Stocker et al., 1999). Dieser Ca^{2+} -Influx kann über unterschiedliche Kanäle ins Zytoplasma stattfinden, wie z.B. dendritische NMDA-Rezeptoren (Kovalchuk et al., 2000) oder spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Magee et al., 1995; Magee and Johnston, 1995). Es wird allgemein angenommen, dass beide AHP durch K^+ -Kanäle mit geringer Leitfähigkeit entstehen (sog. SK-Kanäle, engl. = small conductance) (Blatz and Magleby, 1986; Lancaster and Nicoll, 1987; Storm, 1990; Stocker et al., 1999). Zusätzlich zu ihren unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften sind sie auch pharmakologisch voneinander abgrenzbar. Im Gegensatz zum sAHP ist das mAHP durch das Bientoxin Apamin (einem selektiven SK-Kanal Blocker) eliminierbar (Köhler et al., 1996; Stocker et al., 1999). Allerdings existieren in der Literatur durchaus kontroverse Meinungen, wonach für das mAHP SK-Kanäle nur in geringem Maße oder gar nicht verantwortlich sind. Aus diesem Grund sind auch andere Kanäle (z.B. KCNQ-, HCN-, und BK-Kanäle) in den Fokus der Wissenschaft gerückt und sind aktuell Gegenstand verschiedener Studien (Storm, 1989; Williamson and Alger, 1990; Vogalis et al., 2003; Gu et al., 2005; Gu et al., 2007).

3.5 SK-Kanäle als Ca^{2+} - aktivierte Kaliumkanäle

3.5.1 Kanaltypen

Bereits vor über 50 Jahren wurde erstmals an Erythrozyten nachgewiesen, dass eine Ca^{2+} -Erhöhung im Zytosol zu einer erhöhten K^+ -Permeabilität führte (Gardos, 1958). Nur wenig später wurde durch Experimente in neuronalen Netzwerken von Schnecken und Katzen das Vorkommen von Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen gezeigt. Diese wurden inzwischen auch in weiteren zahlreichen Zelllinien und

Gewebe beobachtet (Meech, 1972; Meech and Standen, 1975; Hotson and Prince, 1980; Schwartzkroin and Stafstrom, 1980). Aus Untersuchungen mit Einzelkanalmessungen lassen sich drei verschiedene durch Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle unterscheiden: BK-Kanäle (auch MaxiK genannt) mit großer Einzelleitfähigkeit (Vergara et al., 1998), IK-Kanäle, die vornehmlich in nicht erregbarem Gewebe exprimiert sind und eine mittlere Einzelleitfähigkeit besitzen (Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997), sowie die SK-Kanäle, welche die jüngste Entdeckung im Rahmen der Untersuchungen nach Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen bilden.

Bisher konnten drei Subtypen der SK-Kanäle kloniert werden (SK1, SK2 und SK3), die der KCNN Genfamilie angehören und durch die Gene KCNN1, KCNN2 und KCNN3 kodiert werden (Köhler et al., 1996). Als vierter Subtyp (SK4) werden heute auch IK Kanäle genannt, die große Homologien mit SK-Kanälen aufweisen (Klein et al., 1980; Joiner et al., 1997; Coetzee et al., 1999). Ihre mRNA konnte in unterschiedlicher Ausprägung im gesamten Säugerhirn nachgewiesen werden. Im Jahre 2005 hat die internationale Union für Pharmakologie eine Einteilung für alle Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle in eine Genfamilie beschlossen, womit eine eindeutige Kennzeichnung erfolgen kann. Demnach erfolgt die Definition für BK-Kanäle in: K_{Ca} 1.1; SK1, SK2, SK3 Kanäle in: K_{Ca} 2.1, K_{Ca} 2.2 und K_{Ca} 2.3; sowie IK-Kanäle in: K_{Ca} 3.1 (Wei et al., 2005).

3.5.2 Kanalstruktur von SK-Kanälen

Weiterführende Untersuchungen erbrachten bis jetzt die Identifizierung dreier Sequenzen des Kaliumkanals: eine Sequenz aus humanem Gehirn (hSK1) und zwei aus Rattenhirn (rSK2, rSK3). Außerdem wurde ein partieller Klon, rSK1, der dem humanen Abbild entspricht beschrieben (Köhler et al., 1996). Sowohl spannungsabhängige, als auch spannungsunabhängige Kaliumkanäle gleichen sich in ihrem Aufbau durch sechs Transmembrandomänen mit einem zytosolischen N- und C-terminalen Ende. Die Domänen fünf und sechs sind dabei an der Bildung der Kanalpore beteiligt. In der Literatur werden nur geringe

Einzelleitfähigkeiten von SK-Kanälen bis zu 20 pS in symmetrischen Kaliumkonzentrationen diskutiert. Kennzeichnend sind Kalziumkonzentrationen im submikromolaren Bereich, die zur Aktivierung benötigt werden (Blatz and Magleby, 1986; Köhler et al., 1996; Xia et al., 1998).

3.5.3 Vorkommen von SK-Kanälen

SK-Kanäle kommen ubiquitär im Säugerorganismus vor. Nicht nur in neuronalen Geweben konnten SK Subtypen ausgemacht werden, sondern auch in peripheren, wie z.B. der Niere, Nebenniere, Leber und dem Herzen. In situ Hybridisierungen und Northern Blot Analysen ergaben, dass SK2 von allen Subtypen am meisten exprimiert wird und am häufigsten im Hippokampus vorkommt (Bond et al., 2004; Hammond et al., 2006). Aber auch SK1 findet sich hippokampal in der CA3 Region, Gyrus dentatus und Subiculum, sowie darüber hinaus im Cerebellum und Cortex. SK3 ist dagegen eher im Putamen, Nukleus accumbens, der Pars compacta der Substantia nigra, sowie in hypothalamischen und thalamischen Gebieten zu finden (Köhler et al., 1996).

3.5.4 Pharmakologie von SK-Kanälen

SK-Kanäle werden auch Apamin-sensitive Ca^{2+} -aktivierte K^{+} -Kanäle genannt. Sie sind die bisher einzig identifizierten Kanäle, die durch das Gift der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) geblockt werden können. Aktuelle Untersuchungen untermauern die Annahme, dass alle drei Untereinheiten spezifisch gehemmt werden (Blatz and Magleby, 1986). SK2 ist der gegenüber Apamin sensitivste Kanalsubtyp ($\text{EC}_{50} \sim 60 \text{ pM}$), während SK1 der unsensitivste ($\text{EC}_{50} \sim 100 \text{ nM}$) Subtyp der SK-Kanäle ist. Eine intermediäre Stellung nimmt hier SK3 ein ($\text{EC}_{50} \sim 1 \text{ nM}$) (Romey et al., 1984; Köhler et al., 1996; Grunnet et al., 2001). Darüber hinaus existieren noch weitere Toxine, die SK-Kanäle antagonisieren, wie das Skorpiongift Tamapin, d-Tubocurarin und das Scyllatoxin bzw. Leiurotoxin (Shakkottai et al., 2001; Pedarzani et al., 2002). Des Weiteren finden auch nicht

peptidische, organische Blocker in der heutigen Forschung Anwendung. Dazu gehören z.B. UCL 1684 oder Bicucullin, die jedoch nicht spezifisch für die Subtypen der SK-Kanäle sind (Khawaled et al., 1999; Strøbaek et al., 2000). Zudem wurden neben den genannten Blockern auch einige Substanzen ausgemacht, die verstärkend auf die Aktivität von SK-Kanälen wirken, wie z.B. 1-EBIO, NS309, CyPPA und Riluzol (Campos Rosa et al., 2000; Strøbaek et al., 2000; Bond et al., 2004; Hougaard et al., 2007). Darüber hinaus gibt es aber noch eine ganze Reihe anderer Substanzen, die experimentell zur Erforschung von SK-Kanälen eingesetzt werden (Wei et al., 2005).

3.5.5 Aktivierung von SK-Kanälen

Kalzium ist für die Öffnung von SK-Kanälen verantwortlich. Da eine direkte Kalziumbindungsstelle am Kanal fehlt, nimmt Calmodulin als kalziumbindendes Protein eine Schlüsselrolle ein. Strukturanalysen haben aufgedeckt, dass es spezifische Domänen an der S6 Transmembrandomäne des SK-Kanals gibt, die Calmodulin-Bindungsdomänen (CaMBD). Kalziumionen heften sich an die an den α -Untereinheiten befindlichen, spezifischen Domänen. Dieser CaM-CaMBD-Komplex ruft eine Konformationsänderung der Kanalpore und Aktivierung des Kanals hervor. Diese führt dann zur Repolarisation bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran (Xia et al., 1998; Keen et al., 1999; Schumacher et al., 2001). Darüber hinaus wird angenommen, dass neben der CaMBD auch Domänen zu finden sind, die durch Kinasen phosphorylierbar sind und so auch für die Modulation der Kanalaktivierung bzw. -hemmung zuständig sind (Köhler et al., 1996). Darüber hinaus führen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse am CaM zu einer Veränderung der Kanalaktivität. Proteinkinase CK2 und Proteinphosphatase 2A (PPA2) bewirken hierdurch eine Modifizierung der Kalziumsensitivität des CaM (Bildl et al., 2004; Allen et al., 2007).

3.6 Zielstellung

Die Auslösung von Aktionspotenzialen in hippokampalen CA1 Neuronen bringt in Folge ein prominentes Nachhyperpolarisationspotenzial, das AHP mit sich, welches sich grundlegend auf die Erregbarkeit der Neurone auswirkt. Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Reduktion des UCL1684-sensitiven Kaliumauswärtsstromes im Modell der chronisch epileptischen Ratte beobachtet werden. Durch transkriptionelle Herunterregulierung von SK2 Kanälen kam es zu einer Reduktion des SK-Kanal-vermittelten AHP nach induzierten Aktionspotenzialsalven (Schulz et al., 2012). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine transiente Verkleinerung der AHP Amplitude im Rattenmodell der chronischen Epilepsie (engl. = kindled rats) feststellen (Behr et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit werden durch intrazelluläre Untersuchungen zellphysiologische Parameter an hippokampalen Hirnschnitten unter Kontrollbedingungen untersucht und mit solchen verglichen, in denen akute epileptiforme Entladungen durch den GABA_A-Kanal Blocker Gabazin induziert wurden. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Beeinflusst akute epileptiforme Aktivität das Nachhyperpolarisationspotenzial?
2. Sind Phosphorylierungen verantwortlich für eine Veränderung des AHP?
3. Welche Proteinkinasen spielen eine relevante Bedeutung in Phosphorylierungsprozessen während akuter epileptiformer Aktivität?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte zur elektrophysiologischen Messung

Folgende Geräte und Materialien wurden verwendet und sind dem Arbeitsschritt ihrer ersten Verwendung zugeordnet.

4.1.1.1 Geräte zur Präparation hippokampaler Schnitte

Gerät	Typenbezeichnung, Lieferant
Aufbewahrungskammer	Eigenbau (IPHYS, Rostock, Deutschland)
Carbogen-Gas (95% CO ₂ , 5% O ₂)	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Doppelspatel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Gasverteilungsrohr	Typ B (Robu, Hattert, Deutschland)
Guillotine	small animal decapitator (Stoelting, Wood Dale, USA)
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD (Schott, Mainz, Deutschland)
Narkosekammer	Eigenbau (IPHYS, Rostock, Deutschland)
O ₂	Linde, Wiesbaden, Deutschland

Rundfilter	55 mm (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Sekundenkleber	UHU, Bühl, Deutschland
Stahlklingen	Campden Instruments, Campden, England
Skalpell	Präzisa plus (P. J. Dahlhausen, Köln, Deutschland)
Silikonschläuche	VWR international, West Chester, USA
Spatellöffel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Vibratom	Integraslice 7550 MM (Campden Instruments, Campden, England)

4.1.1.2 Geräte zur elektrophysiologischen Ableitung

Gerät	Typenbezeichnung, Lieferant
Absaugvorrichtung	ALA VWK (ALA Scientific Instruments, Westbury, USA)
Analog-Digital-Konverter	Power 1401 (CED, Cambridge, England)
Bad	Haake 5 P (Thermo, Karlsruhe, Deutschland)
Badthermostate	Haake C 10 (Thermo, Karlsruhe, Deutschland)
Borosilikatröhrchen	GB120F-8P (Science Products, Hofheim, Deutschland) GB150-8P (Science Products, Hofheim, Deutschland)
Einmalspritze	1ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
Extrazellulärverstärker	Eigenbau (IPhys, Münster, Deutschland)
Faradaykäfig	Eigenbau (IPhys, Rostock, Deutschland)
Frequenzgenerator	Master-8 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel)
Interfacekammer	BSC-HT (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
Intrazellulärverstärker	SEC/GIA 05X (npi electronic, Tamm, Deutschland)
Linsenreinigungspapier	(Kodak, New York, USA)
Mikromanipulator	LBM7 (Scientifica, Harpenden, England)

Mikromanipulatormotor	IW-800 (EXFO, Ontario, Kanada)
Mikromanipulatormotorkontroller	8200 (EXFO, Ontario, Kanada)
Pipettenziehgerät	PIP5 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) P-97 (Sutter Instrument, Novato, USA)
Präzisionspinzette	No. 5 (Dumont & Fils, Montignez, Schweiz)
Rollerpumpe	Minipuls 3 (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
Silberdraht	0,005 Zoll (Science Products, Hofheim, Deutschland)
Spritze	50 ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
Stereomikroskop	Leica MZ 6 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
Temperaturregler	TC-10 (npi electronic, Tamm, Deutschland)
Tisch (schwingungsgedämpft)	Eigenbau (IPhys, Münster, Deutschland)

4.1.1.3 Weiteres Labormaterial

Gerät	Typenbezeichnung, Lieferant
Einmal-Pasteurpipetten	3,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Glasflaschen	500ml, 1000ml, 2000 ml (Schott, Mainz, Deutschland)
Magnetrührer	RH basic 2 (IKA, Staufen, Deutschland)
Messkolben	1000 ml (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)

Messzylinder	100 ml (Brand, Wertheim, Deutschland)
Osmometer	Automatic (Knauer, Berlin, Deutschland)
Personalcomputer	Microsoft Windows XP, Intel Pentium 4 (HP, Palo Alto, USA)
pH-Meter	CG840 (Schott, Mainz, Deutschland)
Reagiergefäß	0,5 ml, 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Rundbodenglas	28,3 mm x 7,2 mm (Knauer, Zehlendorf, Deutschland)
Waage	MC1 analytic AC 1205 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

4.1.2 Chemikalien

4.1.2.1 Chemikalien zur elektrophysiologischen Ableitung

Substanz	Vollständiger Name	Lieferant/Bestellnummer
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calciumchlorid (Dihydrat)	Sigma/C-5080
Ether	Diethylether	Merck/1.00926.1000
Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma/G7528
HCl	Salzsäure (1M)	Merck/1.09057.1000
KCl	Kaliumchlorid	Sigma/P-9333
MgCl_2	Magnesiumchlorid	Sigma/M-8266

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Sigma/M5921
NaCl	Natriumchlorid	Sigma/S-7653
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat	Sigma/S-6297
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat	Sigma/S-8282
NaOH	Natronlauge (1M)	Merck/1.09137.1000
Saccharose	B-D-Fructofuranosyl- α -D-Glucopyranosid	Sigma/S-7903

4.1.2.2 Weitere Chemikalien

Substanz	Vollständiger Name	Pharmakologie	Lieferant/ Bestellnr.
D-AP5	D(-)-2-Amino-5-phosphovalerat	NMDA-Antagonist	Tocris 0106
Gabazin	SR 95531 hydrobromide	GABA _A -Antagonist	Tocris 1262
H-9	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfo- namide dihydrochloride	Proteinkinaseinhibitor	Tocris 0396
H-89	<i>N</i> -[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride	Proteinkinase-A-Inhibitor	Tocris 2910
Ketamin	Esketaminhydrochlorid	nicht-kompetitiver NMDAR-Antagonist	Parke-Davis GmbH (Pfizer®)
Rompun	Xylazinhydrochlorid	α_2 -Adrenozeptor-Agonist	Sigma X1126

4.1.3 Versuchstiere

Tiere	Bezug
Wistar-Ratten	Charles River Deutschland, Sulzfeld

4.1.4 Lösungen zur elektrophysiologischen Ableitung

Substanz	Molekulargewicht	Messlösung		Präparierlösung	
	(g/mol)	(mmol/l)	(g/l)	(mmol/l)	(g/l)
NaCl	58,55	124	7,31875	87	7,31875
NaHCO ₃	84,01	26	2,18426	25	2,10025
KCl	74,56	3	0,22368	2,5	0,22368
NaH ₂ PO ₄	120	1,25	0,15	1,25	0,15
CaCl ₂ •2H ₂ O	147,02	2,5	0,36755	0,5	0,029404
MgCl ₂	95,21	1,9	0,123773	7	0,665
D-Glucose	180,2	10	2,3426	13	2,3426
Sucrose	342,3	0	0	75	25,65
pH-Wert		pH = 7,4		pH = 7,4	

4.2 Methodik

4.2.1 Versuchslösungen

Für die Präparation und Aufbewahrung des hippokampalen Gewebes wurde eisgekühlte Sucroselösung verwendet. Die Präparation des Gewebes erfolgte bei 4°C, die Aufbewahrung bei Raumtemperatur (21°C). In beiden Fällen lag die Osmolalität der Präparationslösung bei 308-320 mosmol/kg H₂O. Die elektrophysiologischen Messungen wurden in künstlichem Liquor (artificial cerebrospinal fluid = ACSF) bei 33°C durchgeführt.

Um die intrazellulären Messungen mit Hilfe von Mikroelektroden zu erleichtern, wurde die Osmolalität der Messlösung auf 302-307 mosmol/kg H₂O herabgesetzt, was zu einem leichten Anschwellen der Zellen führt und eine Penetration mit Hilfe der Mikropipetten erleichterte. Der pH-Wert aller Lösungen wurde mit 1M HCl Lösung auf 7,4 eingestellt. Die Herstellung der Stammlösungen von Gabazin, D-AP5, CNQX, H-9 und H-89 wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und bis zur Badapplikation in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -25°C aufbewahrt.

4.2.2 Herstellung der Mikropipetten

Für die extrazellulären Messungen mit Hilfe von Glaspipetten wurden Borosilikatröhrchen (GB150-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (PIP5, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) so gezogen, dass der Elektrodenwiderstand 2 bis 3 MΩ betrug. Anschließend wurden die Pipetten mit Hilfe einer Mikropipettennadel mit ACSF-Lösung gefüllt.

Die scharfen Glasmikroelektroden (Spitzendurchmesser <0,5 µm) für die intrazellulären Messungen wurden mit einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-97, Sutter Instrument, Novato, USA) und Borosilikatröhrchen (GB120F-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) hergestellt. Die Elektrolytlösung der

intrazellulären Glaspipetten bestand aus 3 M Kaliumacetat und 0,3 M Kaliumchlorid. Bei der Herstellung der Glasmikroelektroden wurde besonders auf den Elektrodenwiderstand geachtet, da dieser ein indirektes Maß für den Spitzendurchmesser ist. Die Elektroden der intrazellulären Ableitungen hatten einen Widerstand von mindestens 60 M Ω und maximal 130 M Ω .

4.2.3 Präparation der hippokampalen Hirnschnitte

In der vorliegenden Arbeit wurden männlichen Wistar-Ratten im Alter von 1-3 Monaten (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Diese wurden bei 27°C und 90% relativer Luftfeuchtigkeit in Gruppenhaltung zu 2–3 Tieren gehalten. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Je Versuchstag wurde eine Ratte (200–260 g) verwendet.

Zur Präparation des Gehirns wurde das Tier durch intraperitoneale Injektion mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (15 mg/kg) anästhesiert. Nach etwa 5 Minuten erfolgte nach Dokumentation einer suffizienten Narkosetiefe mittels Prüfung der Halte-, Stell- und Schmerzreflexe die schmerzlose Dekapitation mit einer Guillotine. Um eventuelle Hypoxieschäden zu vermeiden, dauerte die folgende Präparation des Gehirns nicht länger als eine Minute. Zunächst wurde das Fell mit einem medianen Schnitt skalpiert. Anschließend die Schädelkalotte, sowie die Dura mater ausgehend vom Foramen magnum mit einem medianen Schnitt entlang der Fissura longitudinalis bis zur Bregmannaht gespalten. Nach zwei weiteren lateralen kürzeren Schnitten nach anterolateral und anschließender Abhebung der beiden Schädelhälften konnte das nun freiliegende und für die weitere Präparation nicht weiter benötigte Zerebellum nach posterior mit einem Skalpell abgetrennt und entfernt werden. Mithilfe eines gebogenen Spatels wurden vorsichtig die basalen Hirnnerven durchtrennt, und das Großhirn in eisgekühlte und mit Carbogen begaste Präparationslösung überführt.

Nach einer fünfminütigen Ruhephase wurde dieses dann mit der Konvexität nach unten unter Zuhilfenahme von handelsüblichem Sekundenkleber auf dem Schnittblock der Schneidekammer fixiert, welche dann sofort mit eisgekühlter und carbogenbegaster Präparationslösung befüllt wurde.

Mit dem Vibratom wurden nun mit einem Vortrieb von 12-14 $\mu\text{m/s}$ und einer Schwingungsfrequenz von 80Hz, 450 μm dicke, transversale Hirnschnitte hergestellt. Die Hippocampi wurden vorsichtig mittels gebogener Kleinstspritzen exzidiert und anschließend der Kortex abpräpariert, um eine zusätzliche Aktivität durch kortikale Einflüsse zu verhindern. Diese hippokampalen Schnitte wurden direkt in eine Aufbewahrungskammer mit normaler, begaster Präparationslösung bei Raumtemperatur 20-22°C überführt. In dieser Kammer wurden die Schnitte mindestens 60 Minuten belassen, bevor mit den elektrophysiologischen Messungen begonnen wurde.

4.2.4 Aufbau des Messplatzes und elektrophysiologische Messungen

Die Messungen extra- und intrazellulärer Potenziale erfolgten unter Kontrollbedingungen und nach Induktion spontaner, epileptiformer Aktivität in isolierten hippokampalen Hirnschnitten. Der elektrophysiologische Arbeitsplatz war so aufgebaut, dass sich die Messkammer auf einem vibrationsgedämpften Tisch befand, welcher in sich in einem geerdeten faradayschen Käfig befand, um gegen äußere Störfaktoren abgeschirmt zu sein. Nach Überführung des hippokampalen Schnittes in die Messkammer wurde dieser bei 33°C mit Carbogen-begaster extrazellulärer ACSF-Messlösung, bei einem Fluss von 2 ml/min perfundiert.

Als Ableitelektrode diente eine niederohmige Glaskapillare (2-3 M Ω), die mit frischer Messlösung gefüllt wurde. Über einen chlorierten Silberdraht wurde der Kontakt zum Verstärker hergestellt. Diese Elektrode wurde im Bereich des Stratum radiatum in der CA1 Schicht des Hippocampus positioniert (Abb. 4-1). Als Referenzelektrode im Bad diente ebenfalls ein chlorierter Silberdraht. Referenz- und extrazelluläre Ableitelektrode standen mit dem Extrazellulärverstärker in Verbindung. Bei synchroner Entladung einer Population von Pyramidenzellen im

Sinne einer interiktalen epileptiformen Entladung durch Badapplikation des GABA-Rezeptorblockers Gabazin entstanden so epileptiforme Feldpotenziale (EFP), die nach durchschnittlich 10 Minuten nach Gabazingabe auftraten. Simultan zu den extrazellulären wurden auch intrazelluläre Ableitungen vorgenommen. Dazu diente eine hochohmige (60-130 M Ω), scharfe Glasmikropipette, die unter mikroskopischer Sicht im Stratum pyramidale positioniert wurde (Abb. 4-1). Auch hier bestand die eigentliche Messelektrode aus einem chlorierten Silberdraht, der zusammen mit frischer Messlösung in diese Pipette eingeführt wurde und mit dem Intrazellulärverstärker verbunden war. Die scharfe Mikroelektrode war in den Halteapparat eines motorbetriebenen Mikromanipulators eingespannt, der über eine externe Steuerung betrieben werden konnte.

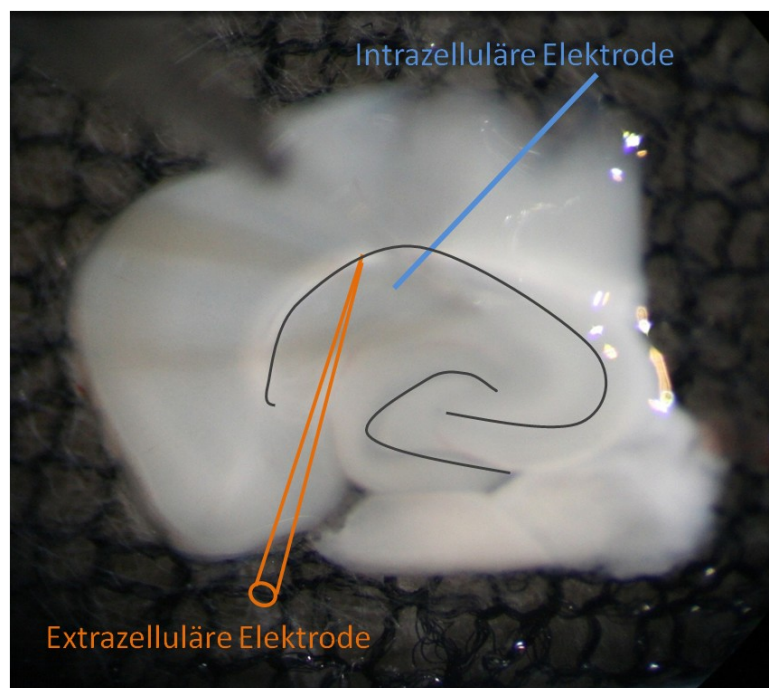


Abbildung 4-1: Positionierung der Feld- und Intrazellularelektrode im Stratum radiatum bzw. pyramidale der CA1-Region des isolierten Hippokampus

Der Pipettenwiderstand wurde über eine Widerstandbrücke kompensiert, worauf dann das Badpotenzial abgeglichen werden konnte. In einem Winkel von 45° der Pipette zur Schnittoberfläche wurde diese in $0,5\ \mu\text{m}$ Schritten durch die Pyramidenzellschicht bewegt, bis eine Zelle penetriert werden konnte. Sofort nach Durchstechung der Zellmembran reagierte die Pyramidenzelle mit der unvermittelten Ausbildung von Aktionspotenzialen (Abb. 4-2).

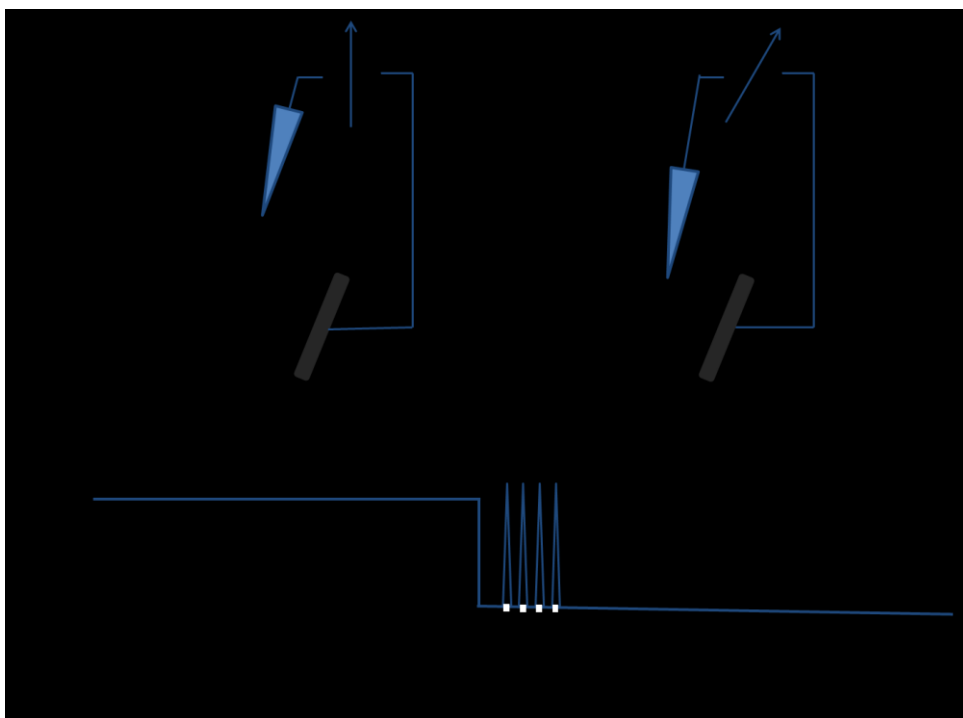


Abbildung 4-2: Intrazelluläre Spannungsmessung mittels Mikroelektrode (schematisch)

Nach einer Erholungszeit von circa fünf Minuten schloss sich das entstandene Leck zwischen Membran und Pipettenspitze und das Membranpotenzial stabilisierte sich. Während dieser Erholungsphase wurde zusätzlich ein die Zelle unterstützender, hyperpolarisierender Haltestrom injiziert. Nach Stabilisierung der Pyramidenzelle konnte dieser Haltestrom schrittweise herunter reguliert werden, bis letztendlich keine Strominjektion mehr nötig war und mit der Aufzeichnung der Spannungssprünge begonnen werden konnte.

Die hyper- und depolarisierende Strominjektion erfolgte intrazellulär über die Ableitelektrode der Pyramidenzellen. Dabei erhöhte sich die Stromstärke in einem zeitlichen Abstand von 1,1 s beginnend bei -1,4 nA um jeweils 0,2 nA bis zur maximal injizierten Stromstärke von 1,4 nA. Die Dauer des einzelnen Strompulses betrug 600 ms. Die Programmierung der Strompulse erfolgte über den Frequenzgenerator Master 8. Durch die Beziehung zwischen injiziertem Strom und Membranspannung wurden passive elektrotonische und aktive Membraneigenschaften bestimmt, die in Abb. 4-3 näher beschrieben sind. Für die Auswertung und Berechnung Zell- und Membraneigenschaften, sowie für die folgenden Messungen wurden nur Zellen mit eingeschlossen, die ein stabiles Ruhemembranpotenzial von mindestens -60mV besaßen.

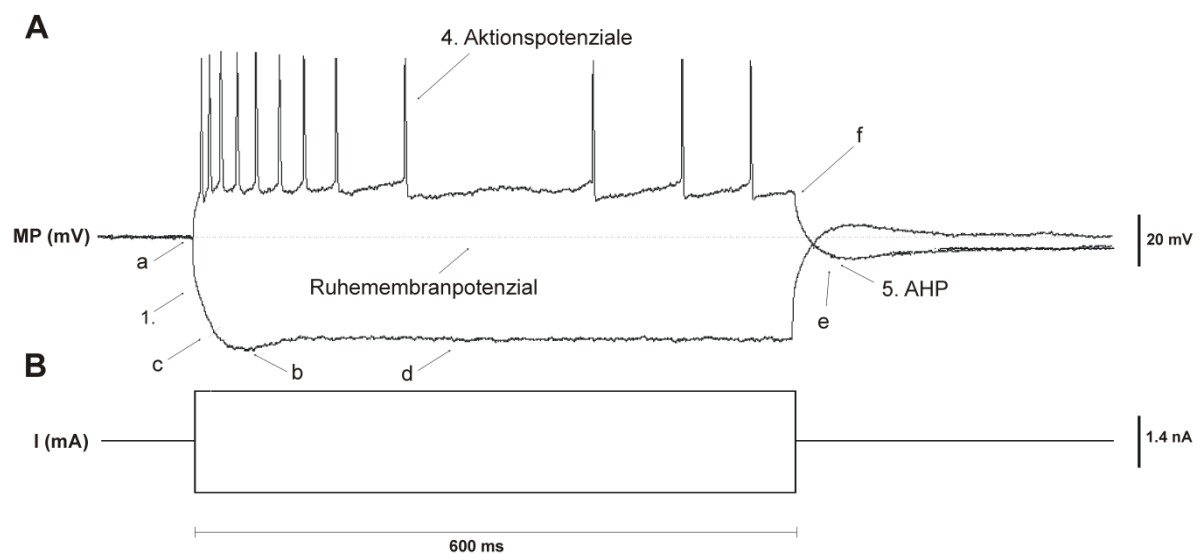


Abbildung 4-3: Strominjektion und gleichzeitige Spannungsmessung

A: Originalableitungen mit dem größten und kleinsten Spannungssprung in hyperpolarisierende bzw. depolarisierende Richtung mit eindeutigem Spannungsverlust (=voltage sag) **B:** Darstellung der injizierten Stromstärke über 600 ms.

Die in der Abbildung 4-3 aufgeführten Buchstaben a bis f bezeichnen jene Abschnitte der Spannungsantwort auf Strominjektion aus denen folgende Messgrößen bestimmt wurden:

1. *Eingangswiderstand (R)*
 - Anstieg der Strom-Spannungskennlinie
2. *Membranzeitkonstante (τ)*
 - zeitlicher Abstand vom Beginn der Stimulation a bis zum Erreichen von 63,2 % der maximalen Hyperpolarisation (c)
3. *voltage sag*
 - Differenz zwischen Membranpotenzial und maximaler Hyperpolarisation b und Membranpotenzial mit durch Hyperpolarisation aktivierte Einwärtsstrom (I_h)d
4. *Anzahl der Aktionspotenziale (engl. = burst)*
5. *Nachhyperpolarisationspotenzial (=AHP)*
 - Differenz zwischen maximalem Depolarisationsende f und maximaler Hyperpolarisation e

4.2.5 Auslösung akuter epileptiformer Aktivität

Während der Versuchsdurchführung war es für gewöhnlich notwendig, verschiedene Pharmaka zu applizieren. Bei der sogenannten Badapplikation wurden alle Substanzen unter gleichen Bedingungen in die ACSF-Lösung eingewaschen. Alle Pharmaka wurden zehn Minuten vor Versuchsbeginn in die ACSF-Lösung appliziert, um eine hinreichende Durchmischung zu erlangen.

Um den Einfluss von akuten epileptiformen Entladungen auf das AHP zu untersuchen, wurde der selektive GABA_A-Rezeptor Blocker Gabazin (5 μ M) verwendet. Nach ca. zehn Minuten traten spontane epileptiforme Entladungen auf, die sowohl mit intra- als auch mit extrazellulären Registrierungstechniken realisiert wurden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden diese Spontanentladungen durch die zusätzliche Applikation des AMPA-Rezeptor Blockers CNQX (10 μ M) und NMDA-Rezeptor Blockers D-AP5 (50 μ M) verhindert, um so zwischen den Effekten der Substanz (Gabazin) und der Wirkung epileptiformer Aktivität auf das AHP unterscheiden zu können. Um den Einfluss phosphorylierender Prozesse untersuchen zu können, wurden zusätzlich zum Gabazin der Proteinkinaseblocker H-9 (100 μ M) und in einer weiteren Versuchsreihe der Proteinkinaseblocker H-89 (1 μ M) appliziert. Es ergaben sich auf diese Weise insgesamt fünf Versuchsreihen.

4.2.6 Auswertung und Statistik

Um die Zellparameter berechnen zu können, wurden jeweils drei Aktionspotenziale einer Zelle berücksichtigt und die entsprechenden Parameter gemittelt. Das mittlere Membranruhepotential jeder Zelle berechnete sich aus den 15 Werten des gemessenen Membranpotenzials vor den 600 ms andauernden Strominjektionen. Der Eingangswiderstand wurde aus der Steilheit der Strom-Spannungs-Kennlinien ermittelt. Dabei wurden nur die hyperpolarisierenden Strominjektionen berücksichtigt, da Aktionspotentiale bei depolarisierenden Strominjektionen auftreten.

Da die berechneten Werte der Membranzeitkonstante während einer intrazellulären Ableitung geringfügig voneinander abwichen, wurden auch diese Werte gemittelt.

Die statistische Aufarbeitung der gewonnen Daten erfolgte mit der Software Microsoft Office Excel 2007. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen vom Mittelwert (S.E.M. engl.: standard error of the mean) angegeben. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde für normalverteilte Stichproben der Student-T-Test vom gepaarten und ungepaarten Typ verwendet, wobei bei einem Fehler $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied angenommen und dies in den Abbildungen mit einem Sternchen gekennzeichnet wurde. Bei Erreichen des 1%-Signifikanzniveaus wurde der Unterschied mit zwei Sternchen versehen.

5 Ergebnisse

5.1 Bestimmung der elektrophysiologische Eigenschaften

Insgesamt wurden zur Bestimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften 63 Neurone intrazellulär im Stratum pyramidale der CA1-Region abgeleitet. In Abhängigkeit der injizierten Stromstärke änderte sich die Membranspannung. Infolge Injektion negativen Stroms hyperpolarisierte die Zelle, wohingegen eine Injektion von positivem Strom die Zellmembran depolarisierte. Die Depolarisation über das Schwellenpotenzial hinaus führte zur Ausbildung von Aktionspotenzialen. In Abhängigkeit der Strominjektionsdauer wurden entweder einzelne oder Salven von Aktionspotenzialen hervorgerufen (burst). Bei prolongierter Depolarisation fanden sich Aktionspotenzialsalven, die von einer nachfolgenden Hyperpolarisation gefolgt wurden (Abb. 4-3).

In den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen wurden zur Berechnung der elektrophysiologischen Membraneigenschaften die Zellen, gemessen unter Kontrollbedingungen, zusammengefasst und die Werte gemittelt. Ebenso wurde mit den Messwerten der Zellen während Substanzapplikation und nach 30 Minuten verfahren. Die Parameter der Zellen unter Kontrollbedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Das mittlere Ruhemembranpotenzial betrug dabei $-68,6 \pm 0,5$ mV, der mittlere Eingangswiderstand $45,0 \pm 1,6$ M Ω . Durch Injektion negativen Stroms hyperpolarisierte die Zellmembran. Hierbei trat eine verzögerte Depolarisation der Zellmembran von $4,4 \pm 0,3$ mV auf, die in der Literatur als voltage sag bezeichnet wird und durch spannungsabhängige Kationenkanäle hervorgerufen wird. Der voltage sag ist schon bei Hyperpolarisation ab 0,2 nA vorhanden und vergrößert sich mit zunehmender, applizierter Stromstärke.

Die Anzahl der Aktionspotenzialhäufigkeit variierte in den gemessenen Zellen erheblich ($15,4 \pm 1,2$; Anzahl: 5-36; Tab.1).

	<u>Mittelwert \pm SEM (n=63)</u>
Membranruhepotential	$-68,6 \pm 0,5$ mV
Eingangswiderstand	$45,0 \pm 1,6$ M Ω
Membranzeitkonstante τ	$10,5 \pm 0,3$ ms
Anzahl der Aktionspotenziale	$15,4 \pm 1,2$
Voltage sag unter Hyperpolarisation	$4,4 \pm 0,3$ mV

Tab. 1: elektrophysiologische Zellparameter der Kontrollpyramidenzelle

5.2 Gabazin-induzierte epileptiforme Aktivität

Die Enthemmung der hippocampalen Schnitte durch Badapplikation des GABA_A-Rezeptor Blockers Gabazin (5 μ M) löste spontane, epileptiforme Entladungen in der CA1-Region aus. Diese wurden simultan zum einen extrazellulär als Feldpotenzialänderungen und zum anderen intrazellulär als Membranpotenzialänderungen registriert. Sie traten etwa zehn Minuten nach Gabazinapplikation auf (Abb. 5-1). Die spontanen epileptiformen Entladungen waren nach 30-minütiger Badapplikation von Gabazin hinsichtlich Frequenz, Amplitude und Morphologie stabil. Intrazellulär traten dabei in CA1-Pyramidenzellen simultan typische paroxysmale Depolarisationen, also langanhaltende Depolarisationen mit überlagerten Aktionspotenzialen auf.

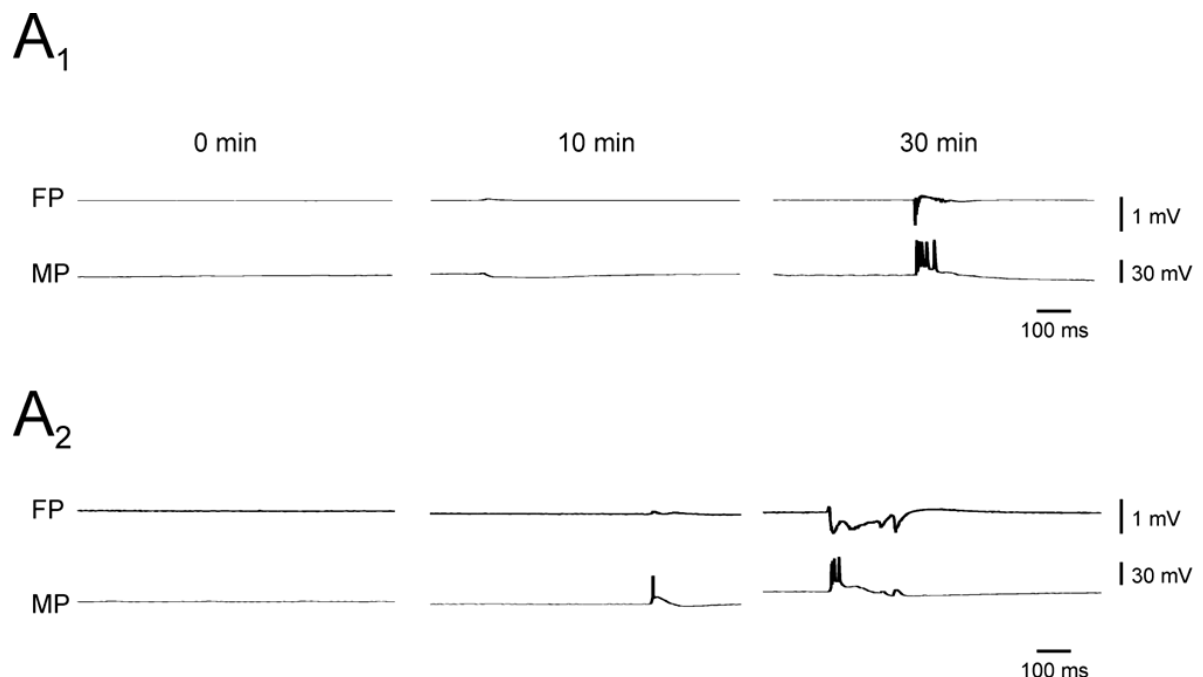


Abbildung 5-1: Auslösung akuter epileptiformer Aktivität

A1/A2: Zwei repräsentative Originalableitungen zeigen das Auftreten spontaner epileptischer Aktivität extra- und intrazellulär. Darstellung von Originalspuren während der Badapplikation von Gabazin (5 μ M). Es wurden sowohl das intra- (MP) als auch extrazelluläre Potenziale (FP) aufgezeichnet.

Unter Gabazinapplikation und fortdauernder epileptiformer Aktivität blieb das Ruhemembranpotenzial nicht stabil, sondern verschob sich zu depolarisierteren Werten auf $-52,5 \pm 4,5$ mV von $-64,9 \pm 1,4$ mV ($n=9$, $p<0,05$; Abb.5-2A). Solch eine Depolarisation war in Kontrollzellen, ohne Gabazingabe, die ebenfalls über 30 Minuten abgeleitet wurden, nicht zu sehen (0min: $-70,3 \pm 1,3$ mV, 30 min: $-71,6 \pm 1,4$ mV, $n=11$; Abb. 5-2A). Um zwischen Gabazin-Effekten und der Wirkung epileptiformer Aktivität zu unterscheiden, wurde in weiteren Experimenten die glutamaterge Transmission durch zusätzliche Gabe von CNQX ($10 \mu\text{M}$) und D-AP5 ($50 \mu\text{M}$) unterdrückt. Unter diesen Bedingungen trat ebenfalls keine Änderung des Ruhemembranpotenzials auf (Abb.5-2). Neben der Beeinflussung des Ruhemembranpotenzials unter Gabazinapplikation war außerdem eine Zunahme des Membranwiderstandes von $44,6 \pm 2,8$ mV auf $53,9 \pm 5,6$ mV ($n=9$, $p=0,08$, Abb. 5-2B) auffällig. In den Experimenten nach Hemmung der glutamatergen Transmission blieb der Membranwiderstand allerdings unbeeinflusst (0 min: $52,7 \pm 5,6$ mV, 30 min: $52,5 \pm 7,5$ mV, $n=11$, Abb. 5-2B).

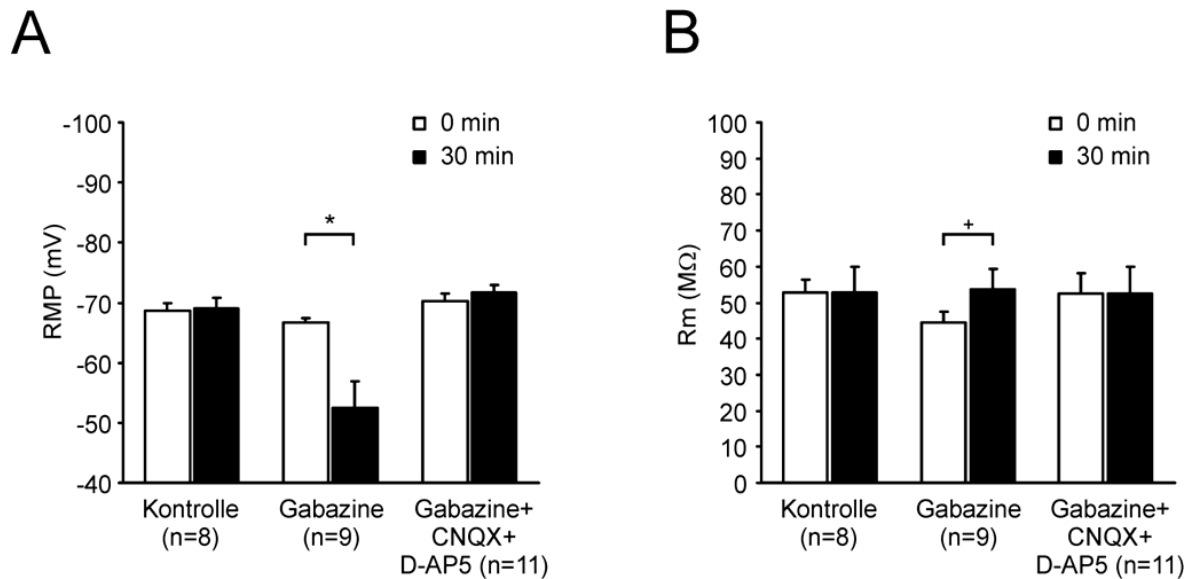


Abbildung 5-2: Beeinflussung des Ruhemembranpotenzials (RMP) und Eingangswiderstandes (R_m) durch Gabazin (5 μ M)

Die Balkendiagramme zeigen die Durchschnittswerte für Ruhemembranpotenzial (RMP) und Widerstand (R_m) zu Beginn der Messung (0 min) und nach 30 Minuten (30 min) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle), nach Applikation von Gabazin (5 μ M) und unter zusätzlicher Blockade glutamaterger synaptischer Transmission (Gabazin + CNQX + D-AP5). **A:** Balkendiagramm mit Darstellung des Ruhemembranpotenzialverlaufes (RMP) nach Applikation von Gabazin mit signifikanter Verschiebung des Membranpotenzials zu depolarisierteren Werten und ohne Effekt nach zusätzlicher Blockade glutamaterger Transmission mit CNQX (10 μ M) und D-AP5 (50 μ M). **B:** Balkendiagramm mit Darstellung des Eingangswiderstandes (R_m) und leichtem Anstieg des Eingangswiderstandes bei Gabazin-behandelten Zellen, aber nicht in Kontrollen und nach zusätzlicher Blockade glutamaterger Transmission mit CNQX (10 μ M) und D-AP5 (50 μ M).

5.3 Die Unterdrückung des AHP durch epileptiforme Aktivität

Um das Nachhyperpolarisationspotenzial zu untersuchen, wurden nach der Stabilisierungsphase 600ms dauernde hyper- und depolarisierende Spannungssprünge durch intrazelluläre Strominjektion zwischen -1,4 nA und +1,4 nA ausgelöst. Die Injektion positiven Stromes führte zur Auslösung von Aktionspotenzialen, deren Anzahl über eine erhebliche Breite variierte (Vgl. Tab. 1). Die maximale Anzahl korrelierte weder mit dem Nachhyperpolarisationspotenzial (AHP; $r^2=0,0407$; $n=63$), noch mit dem Ruhemembranpotenzial (RMP; $r^2=0,0096$, $n=63$).

Daher war es möglich -unabhängig vom Verhalten der Pyramidenzellen- die Amplitude des AHP nach anhaltender Depolarisation zu berechnen. Das AHP veränderte sich mit fortschreitender Versuchsdauer nicht und blieb die gesamte Messdauer von 30 Minuten stabil (0min: $-14,6 \pm 0,4$ mV, 30min: $-13,2 \pm 0,8$ mV, $n=8$; Abb. 5-4B). Nach Gabazin-Applikation kam es hingegen zur Reduktion der AHP Amplitude um etwa 40%. So lag die Amplitude des AHP nach Gabazin-Gabe bei $-7,6 \pm 0,9$ mV, ausgehend von Kontrollwerten vor Substanzgabe von $-12,6 \pm 1,2$ mV (0 min: $-12,6 \pm 1,2$ mV, 30 min: $-7,6 \pm 0,9$ mV, $n=9$, $p<0,05$). Nach zusätzlicher Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission durch Co-Applikation von CNQX und D-AP5 zeigte sich wiederum keine Suppression des AHP (0 min: $-13,4 \pm 0,9$ mV, 30 min: $-12,8 \pm 0,8$ mV, $n=11$). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Amplitudenverkleinerung des AHP nicht durch die inhibitorische Wirkung des Gabazins am GABA_A-Rezeptor und dessen Leitfähigkeit für Cl⁻ Ionen verursacht ist. Vielmehr ist die Suppression des AHP der epileptischen Aktivität geschuldet, die durch Gabazin hervorgerufen wird.

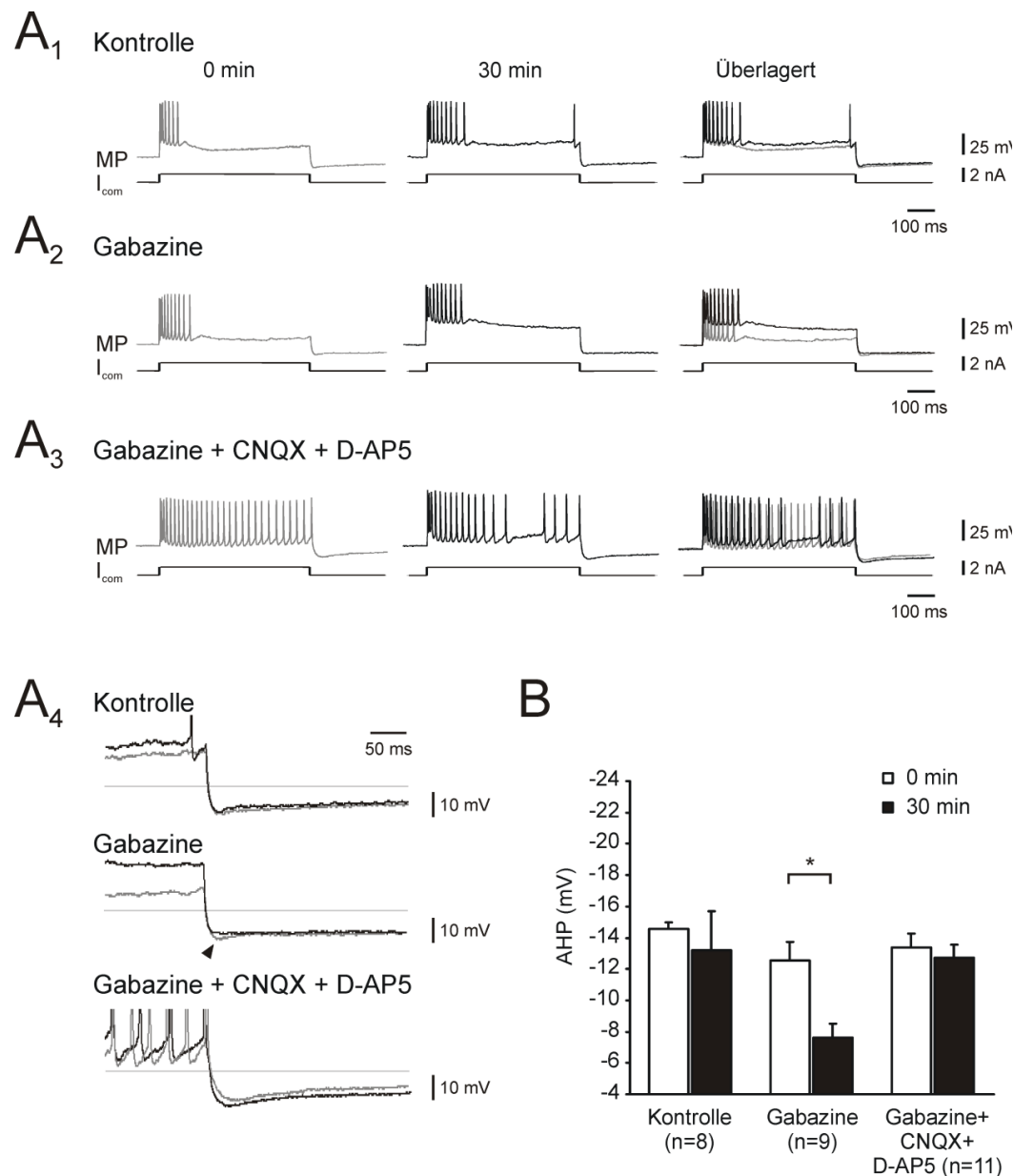


Abbildung 5-3: Reduktion des AHP unter Einfluss von Gabazin

A: Originalableitungen des Membranpotenzials aus CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus zum Zeitpunkt zu Beginn des Versuchs (0 Min.) und nach jeweils einer halben Stunde (30 Min.) Das Membranpotenzials wurde durch depolarisierende Strominjektion von +1,4 nA verändert **A₁:** Das AHP bleibt in Kontrollpräparaten über den Untersuchungszeitraum hinweg stabil **A₂:** Die Applikation von Gabazine führt zur Reduktion des AHP **A₃:** Nach Blockade der glutamatergen synaptischen Transmission mit CNQX und D-AP5 bleibt das AHP ebenfalls stabil **A₄:** Ausschnittvergrößerung mit Zeit- und Amplitudenspreizung der Originalregistrierung. Die grauen Linien zeigen das Membranpotenzial vor Gabazin-Gabe. Die Pfeilspitze deutet auf die AHP-Reduktion unter dem Einfluss von Gabazin. **B:** Säulendiagramm mit Vergleich der Reduktion der AHP Amplitude in Gabazin-behandelten Schnitten und der Kontrollgruppe und unter Zugabe von CNQX, D-AP5 mit Gabazin. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Die Untersuchungen zeigten, dass sich das Membranpotenzial der Pyramidenzellen in der CA1-Region nach Gabazinapplikation veränderte. Um auszuschließen, dass die Unterdrückung des AHP ein Effekt der Membrandepolarisation ist, wurde das Membranpotenzial der CA1-Neurone in einer weiteren Versuchsreihe durch intrazelluläre Strominjektionen (0 nA – 0,8 nA; 0,2 nA Schritte) variiert. Die Amplitude des AHP war vergrößert und korrelierte positiv mit dem Membranpotenzial. Demnach konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der AHP Amplitude kein Artefakt der Membrandepolarisation war ($r^2=0,9371$, $n=5$, $p<0,01$, Abb. 5-4).

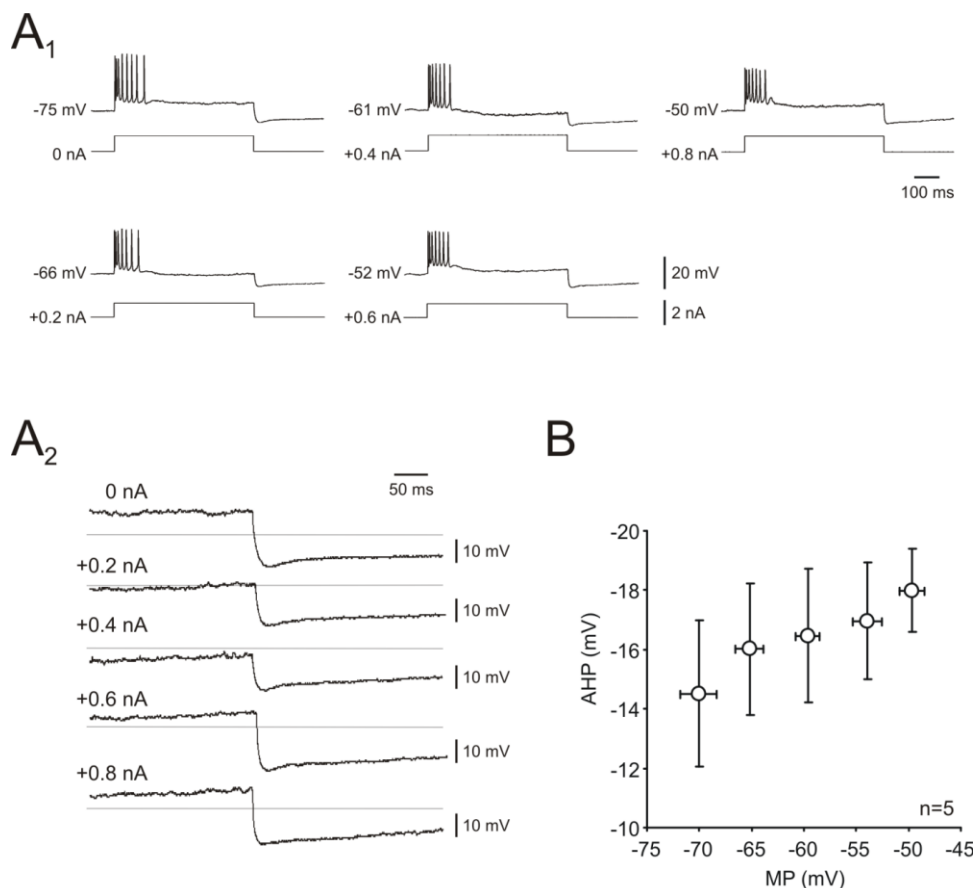


Abbildung 5-4: Vergrößerung der AHP Amplitude durch Membrandepolarisation

A₁: Darstellung repräsentativer Originalableitungen, die eine Depolarisation des Membranpotenzials von CA1-Pyramindenzellen nach verlängerter Depolarisation von 600 ms zeigen. **A₂:** Ausschnittvergrößerungen und Darstellung der Verschiebung des Membranpotenzials, sowie Vergrößerung der AHP Amplitude. Die grauen Linien zeigen das Membranruhepotenzial vor der Stromapplikation. **B:** Im Streudiagramm dargestellt ist die Abhängigkeit des AHP vom Ruhemembranpotenzial

5.4 Die Unterdrückung des AHP durch Proteinkinase Inhibition

Es stellte sich im Weiteren die Frage, welcher Mechanismus für die Unterdrückung der AHP Amplitude verantwortlich ist. Mögliche Ursachen der Modulation des AHP können Phosphorylierungsprozesse sein, die durch epileptiforme Aktivität ausgelöst werden. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden weitere Experimente mit den Proteinkinaseblockern H-9 und H-89 durchgeführt.

Eine Versuchsreihe wurde mit H-9 in einer Konzentration von 100 μM durchgeführt, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener phosphorylierender Kinasen (PKA, PKG, PKC, CaMK II) zu inhibieren (Ito and Kobayashi, 1992). Danach folgten weitere Messungen mit H-89 in einer Konzentration von 1 μM . H-89 hemmt vorwiegend die Proteinkinase A (Lochner and Moolman, 2006). Zunächst wurde der Einfluss von Proteinkinase Inhibitoren auf das AHP untersucht. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurden Pyramidenzellen sowohl intra- als auch extrazellulär unter Zugabe von Gabazin und H-89 bzw. Gabazin und H-9 gemessen (s. Abb. 5-5A).

Um nachzuweisen, dass Proteinkinaseblocker allein appliziert keinen Einfluss auf die Pyramidenzellen der CA1-Region haben, wurde dieses Experiment auch unter alleiniger Zugabe von H-9 durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigten, dass weder epileptische Aktivität ausgelöst, noch das Ruhemembranpotenzials verändert wurde (0 min: $-70,5 \pm 1,7$ mV, 30 min: $-67,7 \pm 3,6$ mV, $n=5$, Abb. 5-5B).

Unter Beigabe von Gabazin zeigte sich, dass epileptiforme Aktivität in beiden Versuchsreihen weiterhin auslösbar war. Darüber hinaus fand mit Ausbildung epileptiformer Entladungen die Verlagerung des Ruhemembranpotenzials in depolarisierende Richtung statt (H-9: 0 min: $-70,9 \pm 1,7$ mV, 30 min: $-63,8 \pm 1,9$ mV, $n=6$, $p<0,05$, Abb. 5-5B) und (H-89: 0 min: $-70,1 \pm 0,7$ mV, 30 min: $-60,9 \pm 1,5$ mV, $n=7$, $p<0,01$, Abb. 5-5B).

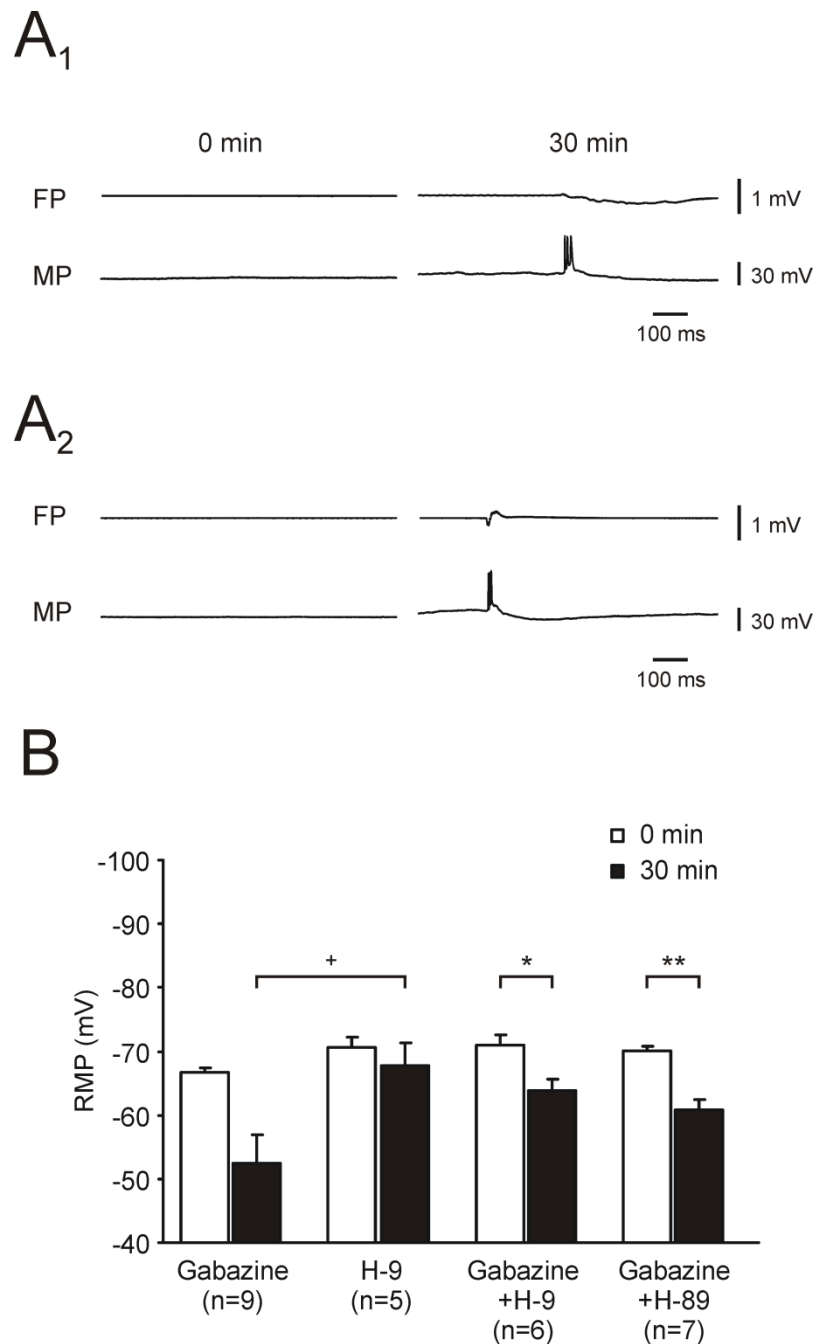


Abbildung 5-5: Auslösung epileptischer Aktivität durch Gabazin auch in Anwesenheit von H-9 und H-89

A: Repräsentative Originalableitungen zeigen intra- als auch extrazelluläre epileptische Aktivität von CA1-Neuronen sowohl nach Applikation von Gabazin und H-9 (**A₁**), als auch von Gabazin und H-89 (**A₂**). **B:** Das Säulendiagramm zeigt die signifikante Reduktion des Ruhemembranpotenzials in den Zellen, die zusätzlich zum Gabazin mit dem Proteinkinaseblocker H-9, bzw. H-89 behandelt wurden. Die Werte des RMP der Gabazin-Zellen sind der Abb. 5-2 entnommen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Um zu testen, ob Phosphorylierungsprozesse verantwortlich für die Unterdrückung der AHP Amplitude sein könnten, wurden erneut intrazellulär verlängerte Depolarisationen in Form von Spannungssprüngen appliziert. Unter Zugabe von Gabazin mit H-9 und Gabazin mit H-89 wurde das AHP nach einer Folge von Aktionspotenzialen untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass beide Proteinkinaseblocker mit Gabazin die Reduktion des AHP nach Auslösung akuter epileptiformer Aktivität verhinderten (Abb. 5-6A₁₋₃, vergrößert in A₄). Während sich die AHP-Amplitude in der Versuchsreihe mit Gabazin und H-9 nur marginal von $-10,7 \pm 0,5$ mV auf $-9,7 \pm 0,6$ mV verkleinerte (0 min: $-10,7 \pm 0,5$ mV, 30 min: $-9,7 \pm 0,6$ mV, n=6), vergrößerte sie sich in der Versuchsreihe mit Gabazin und H-89 (0 min: $-11,6 \pm 0,8$ mV, 30 min: $-13,4 \pm 1,6$ mV, n=7; Abb. 5-6B). Im Vergleich zwischen der AHP-Amplitude in der Versuchsreihe mit alleiniger Gabazin Behandlung und der mit zusätzlicher Gabe von H-9 bzw. H-89 zeigt sich eine Vergrößerung, wobei diese in der H-89 Versuchsreihe signifikant ist (*p=0,07 bzw. *p<0,05, ungepaarter Student-t-Test).

H-9 alleine führt zu keiner Reduktion der AHP-Amplitude. Eine Erklärung hierfür könnte eine nur unwesentliche Beteiligung durch Proteinkinasen unter Kontrollbedingungen sein. Die Resultate dieser Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Auslösung akuter, epileptiformer Entladungen in einem isolierten, hippocampalen Hirnschnitt eine Amplitudenverkleinerung des Nachhyperpolarisationspotenzials bedingt. Verantwortlich hierfür scheinen offensichtlich Phosphorylierungsprozesse zu sein.

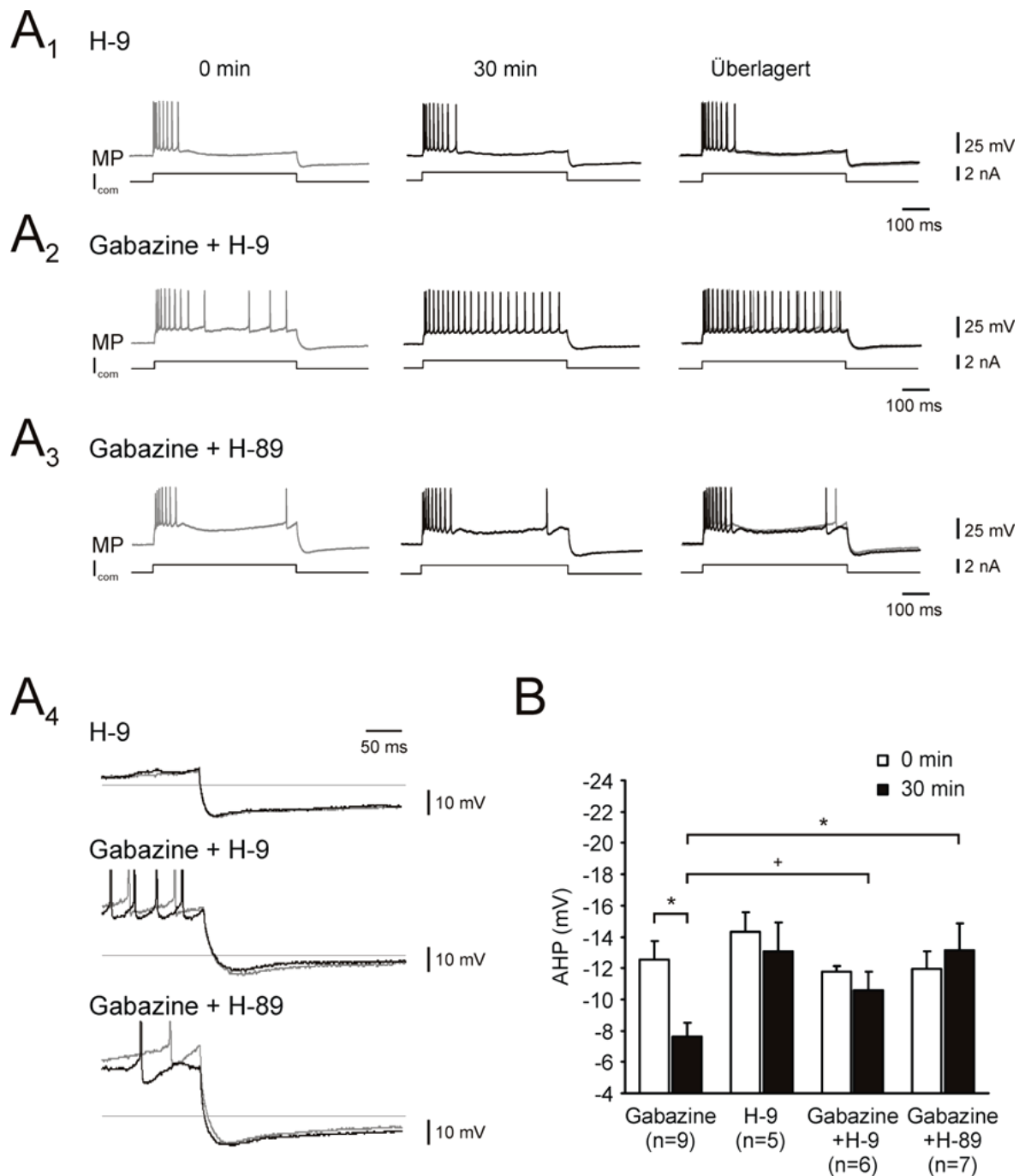


Abbildung 5-6: H-9 und H-89 additiv zu Gabazin verhindern eine AHP Reduktion

A: Repräsentative Originalableitungen zeigen drei Versuchsreihen zum Zeitpunkt 0 Minuten (0 min) und nach 30 Minuten (30 min). **A₁:** H-9 verändert die AHP-Amplitude nicht. **A₂-A₃:** Gabazin und H-9 bzw. Gabazin und H-89 haben keinen Einfluss auf das AHP. **A₄:** Die grauen Linien in der Vergrößerung zeigen das Membranpotenzial unter Kontrollbedingungen. **B:** Das Säulendiagramm zeigt, dass das AHP in den CA1-Neuronen unbeeinflusst blieb, die mit Gabazin und H-9 bzw. H-89 behandelt wurden. Die Werte der Gabazin-behandelten Zellen wurden aus Abb. 5-3 entnommen

6 Diskussion

Das AHP und die zugrunde liegenden elektrophysiologischen Mechanismen sind seit vielen Jahren Bestandteil intensiver Forschung. Eine verlängerte Depolarisation induziert Aktionspotenzialsalven, die von einer Hyperpolarisation gefolgt werden. Die molekulare Grundlage stellt die Aktivierung spannungsunabhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanäle, sog. SK-Kanäle, aber auch HCN- und KCNQ-Kanäle dar (Stocker et al., 1999; Stackman et al., 2002). An einem Rattenmodell chronischer Epilepsie konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei der Temporallappenepilepsie eine Herunterregulierung der mRNA für SK2 Kanäle stattfindet, was eine AHP Amplitudenverkleinerung zur Folge hatte (Schulz et al., 2012). Ziel dieser Arbeit war es daher, erstmals festzustellen, ob einer AHP-Unterdrückung auch nicht-transkriptionelle Prozesse zugrunde liegen könnten und, wenn sich dies bestätigen sollte, die beteiligten Mechanismen näher zu beleuchten.

6.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Pyramidenzellen zu untersuchen, wurden intrazelluläre Messungen mit Glasmikropipetten vorgenommen. Durch die langanhaltende, überschwellige Depolarisation (600ms) der CA1-Pyramidenzelle wurden Aktionspotenzialsalven ausgelöst. Die meisten dieser Neurone sind in die Gruppe der regelmäßig feuernenden Neurone einzuordnen. Die Anzahl der Aktionspotenziale nahm mit steigender Depolarisation zu und verringerte sich mit fortbestehender Depolarisation. Die hier gezeigten Ergebnisse sind mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar (Madison and Nicoll, 1984; Jensen et al., 1994; Staff et al., 2000). Die Anzahl der induzierten Aktionspotenziale variierten über eine erhebliche Breite (5-36 APs/600ms). Eine Erklärung hierfür könnte in der proximal-distalen Achse in Bezug zum Subiculum liegen. Schon sehr früh konnte am Meerschweinchen nachgewiesen werden, dass distale CA1 Pyramidenzellen (Nähe Subiculum) häufiger Aktionspotenzialsalven erzeugen als proximale (Nähe CA3 Region).

(Masukawa et al., 1982). Auch neuere Studien konnten diese Ergebnisse reproduzieren und legen neuronaler Netzwerkerregbarkeit, Informationsweiterleitung und synaptischer Plastizität die Ausbildung von Aktionspotenzialsalven zu Grunde (Pike et al., 1999; Krahe and Gabbiani, 2004). Aufgrund der minimalen morphologischen Heterogenität und Präparationsunterschiede war eine exakte Reproduktion des Messortes in der CA1 Region schwierig und die Variation nach proximal und distal möglich, so dass hier eine Ursache für die unterschiedliche Anzahl an Aktionspotenzialen zu sehen ist. Da sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Aktionspotenziale und dem AHP oder dem Ruhemembranpotenzial ergab, war es möglich, unabhängig von der Entladungsrate der Neuronen die AHP Amplitude nach Depolarisation zu bestimmen.

Bereits vielfach wurden in der Literatur auch die passiven Membraneigenschaften, wie Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante, von Pyramidenzellen dokumentiert. Im Vergleich zu denen in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen sie keine bedeutenden Unterschiede auf (Azouz et al., 1996; Jensen et al., 1996; Jarsky et al., 2008). In Hinblick auf die hier durchgeführten Experimente kann man also darauf schließen, dass die vorliegenden Ergebnisse mit der Literatur durchaus vergleichbar sind.

6.2 Generierung akuter epileptiformer Aktivität im neuronalen Netzwerk

Das Nachhyperpolarisationspotenzial im akuten Epilepsiemodell der Ratte ist bis heute noch unzureichend erforscht. Um den Einfluss akuter epileptiformer Aktivität auf das AHP zu analysieren, wurde den vorliegenden Experimenten der GABA_A-Rezeptorblocker Gabazin (5µM) verwendet. GABA_A-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Ionenkanäle, die für Chlorid- und Bikarbonationen durchlässig sind. Als der wichtigste inhibitorische Rezeptor im zentralen Nervensystem ist er ubiquitär zu finden. Seine Aktivierung führt im adulten Gehirn zur Hyperpolarisation, welche durch die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit für Cl⁻-Ionen hervorgerufen, sofern das Gleichgewichtspotenzial für Chloridionen

negativer ist, als das Ruhemembranpotenzial (Kittler et al., 2002). Neben dieser hyperpolarisierenden Wirkung wurden aber auch depolarisierende Effekte durch GABA beobachtet, wie zum Beispiel im unreifen Nervensystem (Ben-Ari et al., 1989) oder nach Insult, wie Trauma, Ischämie oder Epilepsie (Galanopoulou, 2007). Der Mangel an GABA_A-Rezeptoren oder der Kanalproteine ist ggf. Ursache einer Epilepsie oder affektiven Störung; dieser Zusammenhang bedarf weiterer intensiver Untersuchungen (Fritschy, 2008). Epileptiforme Aktivität ist im höchsten Maße durch GABA induzierte Inhibition beeinflusst (Treiman, 2001). Außerdem wurde berichtet, dass bereits 10-20% weniger hemmende Einflüsse ausreichen um eine Epilepsie zu generieren und ihre Ausbreitung im neuronalen Netzwerk zu unterstützen (Chagnac-Amitai and Connors, 1989).

Als ein essentieller, inhibitorischer Neurotransmitter befindet sich GABA in Ruhe extrazellulär, wobei unterschiedliche Konzentrationen in der Literatur beschrieben wurden; sie reichen von 0,2 – 2,5µM (Lerma et al., 1986; Tossman and Ungerstedt, 1986; Ding et al., 1998; Kuntz et al., 2004). Aufgrund der Dynamik der Transmitterfreisetzung aus der Präsynapse und Eigenschaften der GABA_A-Rezeptoren an der Postsynapse wird durch die prominenteste Population an Rezeptoren nebst phasischer, eine tonische Inhibition hervorgerufen (Mody, 2001; Glykys and Mody, 2007). Es ist bekannt, dass diese zwei Arten von Inhibition eine unterschiedliche Anordnung der Rezeptorproteine und somit Transmitteraffinität zu Grunde liegt. Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren befinden sich dabei in einer günstigeren Lage, als postsynaptische und können so aufgrund ihrer hohen Transmitteraffinität schon durch niedrige Konzentrationen von GABA aktiviert werden. Dieser Strom, der durch die extrasynaptischen Rezeptoren generiert wird, reagiert höchst sensitiv schon auf geringe Mengen an GABA und resultiert in einer tonischen Inhibition (Essrich et al., 1998; Hevers and Lüddens, 1998; Brown et al., 2002; Farrant and Nusser, 2005). Angesichts dieser tonisch hemmenden Wirkung von GABA an der postsynaptischen Zellmembran ruft eine Inhibition der GABA_A-Rezeptoren durch den Rezeptorblocker Gabazin einen Wegfall dieser hervor und führt zur Ausbildung epileptiformer Aktivität. Dies konnte auch in den hier dargestellten Versuchen reproduziert werden. Nach Applikation von Gabazin konnte hier gezeigt werden, dass es innerhalb von etwa zehn Minuten zu

spontaner epileptiformer Aktivität kam (s. Abb. 5-1). Gleiche Ergebnisse konnten unlängst auch in einer vorhergehenden Arbeit gezeigt werden (Pegoraro et al., 2010).

Stell und Mody vertieften 2002 in einer Arbeit die Theorie, dass auch der kompetitive Rezeptorblocker Gabazin in unterschiedlichen Konzentrationen eine separate Inhibition der Rezeptoren vermittelt. Eine niedrige Konzentration im nanomolaren Bereich ist nachweislich nur in der Lage, die hochaffinen, extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren zu blockieren. Hohe Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind fähig beide Ströme, also die phasischen, als auch tonischen zu inhibieren (Stell and Mody, 2002). Damit wurde eine vorhergehende Arbeit bestätigt, in der nachgewiesen wurde, dass mit einer Gabazinkonzentration im mikromolaren Bereich (5 μ M) auch tonische Ströme inhibiert werden können (Overstreet and Westbrook, 2001). Deswegen wurde auch für unsere Experimente eine Konzentration von 5 μ M verwendet, um sicher die phasische und tonische Komponente der inhibierenden Wirkung von GABA auf seine entsprechenden Rezeptoren sicherzustellen und die Auslösung von epileptischer Aktivität hervorzurufen. Gleichwohl gibt es in der Literatur aber auch widersprüchliche Erkenntnisse. So konnte in einer Veröffentlichung durch Bai et. al belegt werden, dass nach Applikation von Gabazin in einer Konzentration von 20 μ M nur phasische Ströme inhibiert werden konnten, tonische dabei aber unbeeinflusst blieben (Bai et al., 2001). Selektiv wird durch Gabazin der GABA - induzierte Cl⁻-Strom inhibiert und führt demzufolge zu einem Wegfall des hemmenden Effekts von GABA an den spezifischen Rezeptoren und zur Auslösung von epileptiformen Entladungen. Im Gegensatz zu anderen Substanzen, die akute Entladungen auslösen (z.B. Pentylenetetrazol), wirkt Gabazin schon bei Konzentrationen weit unter dem mikromolaren Bereich. Somit hat es kaum Auswirkung auf die Vitalität der Neuronen (Lappin et al., 2005).

Eine weitere etablierte Methode zur Auslösung akuter, epileptiformer Entladung ist die Verwendung des GABA_A-Blockers Bicucullin. Für unsere Versuche in dieser Studie war diese Substanz aber nicht ideal, da es bekanntlich auf das Nachhyperpolarisationspotenzial einen unterdrückenden Effekt aufweist und somit

ungeeignet ist, das AHP nach akuten Entladungen zu untersuchen (Schwartzkroin and Prince, 1980; Williamson and Wheal, 1992; Khawaled et al., 1999). Für Gabazin wurde solch eine AHP-modifizierende Eigenschaft, auf Grund einer Interaktion mit SK-Kanälen, nicht belegt (Seutin et al., 1997). Weiterhin ist beschrieben, dass Gabazin eine höhere Potenz und Spezifität in Bezug auf die Rezeptorblockung aufweist als Bicucullin. Damit ist es als Substanz zur Auslösung akuter epileptiformer Aktivität am besten geeignet (Ito et al., 1992; Uchida et al., 1996).

6.3 Bedeutung der Hemmung von Glutamatrezeptoren im neuronalen Netzwerk

Gabazin führte nach Einwaschen in die ACSF-Lösung zur Depolarisation von CA1 Pyramidenzellen und resultierte in der Ausbildung akuter epileptiformer Aktivität, die sowohl extrazellulär, als auch intrazellulär, aufgezeichnet werden konnte. Als Konsequenz der Hemmung GABAerger Transmission verschob sich das Membranpotenzial zu depolarisierteren Werten. In den Kontrollexperimenten dieser Versuchsreihe war eine signifikante Änderung des Ruhemembranpotenzials über die gesamte Dauer des Experimentes jedoch nicht zu verzeichnen. Passend hierzu zeigt auch eine Arbeit von Pegoraro et al., dass die Behandlung von Hirnschnitten mit Gabazin die hyperpolarisierende Wirkung der GABA-Rezeptoren nicht beeinflusste (Pegoraro et al., 2010).

An der postsynaptischen neuronalen Membran sind neben den beschriebenen inhibitorischen, hyperpolarisierenden Strömen auch excitatorische Potenziale ausschlaggebend für die Erregungsweiterleitung. Glutamat als wichtigster excitatorischer Neurotransmitter spielt dabei eine entscheidende Rolle, indem es als Agonist für NMDA- und AMPA-Rezeptoren in der Postsynapse die Offenwahrscheinlichkeit für Kationen heraufsetzt und dadurch zur Ausbildung excitatorischer, postsynaptischer Potenziale führt (EPSPs). Andererseits ist die Aktivität der NMDA-Rezeptoren (NMDAR) infolge der Ionenblockade durch Magnesiumionen auch von der Membranspannung abhängig (Clarke and

Johnson, 2008). Die Inhibition von GABA_A-Rezeptoren mittels Gabazin depolarisiert die Membran, führt zur Verringerung dieser magnesiumabhängigen Blockade und steigert gleichsam die Leitfähigkeit für Kationen nach Aktivierung mit Glutamat. Es resultiert die Auslösung von epileptiformen Entladungen nach Applikation von Gabazin.

Ein Zufallsbefund dieser Experimente war, dass die durch Gabazin induzierte Membrandepolarisierung nach Blockierung der beiden exzitatorischen Glutamatrezeptoren mit CNQX und D-AP5 nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die oben beschriebene tonische GABA-Freisetzung, wiederum durch phasische, exzitatorische Impulse getriggert wird. Bisher wurden viele Ursprünge für eine normale GABA-Konzentration diskutiert, wie z.B. Freisetzung aus Astrozyten (Kozlov et al., 2006), aus Vesikeln und nicht-vesikulär, aber auch Freisetzung durch Triggerung mit Aktionspotenzialen (Rossi et al., 2003; Bright et al., 2007). Bereits vor einigen Jahren konnte die Arbeitsgruppe um Glykys und Mody im Mausmodell zeigen, dass der größte Teil des extrazellulären GABA aus den gleichen Vesikeln freigesetzt wird, die für eine phasische Inhibition zuständig sind (Glykys and Mody, 2007). Aufgrund der engen Verbindung zwischen tonischer GABA Inhibition und der Entstehung von Epilepsie ist es demnach entscheidend zu wissen, woher die Transmitter stammen, die für diese Art der Hemmung zuständig sind (Houser and Esclapez, 2003; Peng et al., 2004). In den letzten Jahren haben die potenziellen Quellen von extrazellulärem GABA, welches zur Aktivierung peri- und extrasynaptischer Rezeptoren verantwortlich ist, immer mehr das Interesse aktueller Forschung geweckt. Ein Grund hierfür ist die Weiterentwicklung von Substanzen, die GABA-Konzentrationen, insbesondere über Rezeptorinhibition, modulieren und somit große therapeutischen Potenziale in Behandlung der Epilepsie aufweisen (Eckstein-Ludwig et al., 1999; Perucca, 2005)

6.4 AHP-Suppression und die Bedeutung im neuronalen Netzwerk

Die vorliegende Arbeit konnte an einem Rattenmodell der akuten Epilepsie nachweisen, dass nach Induktion akuter epileptiformer Aktivität das Nachhyperpolarisationspotenzial supprimiert wurde. Es ist weitreichend bekannt, dass hyperpolarisierende Kaliumauswärtsströme das Entladungsverhalten von CA1-Zellen im Hippokampus beeinflussen. Bis heute belegen eine Vielzahl von Studien den Einfluss von SK-Kanälen auf das AHP und resultierender neuronaler Exzitabilität (Alger and Nicoll, 1980; Hotson and Prince, 1980; Gustafsson and Wigström, 1981; Madison and Nicoll, 1984; Alger and Williamson, 1988; Williamson and Alger, 1990; Köhler et al., 1996; Bond et al., 2004). Erst kürzlich konnte in der eigenen Arbeitsgruppe eine Reduktion des SK-Kanal vermittelten AHP am Rattenmodell der chronischen Epilepsie nachgewiesen werden (Schulz et al., 2012). Dies hatten 2000 auch schon Behr et al. belegen können (Behr et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Herunterregulierung von SK2-Kanälen ausschlaggebend für die AHP-Supprimierung ist. Darüber hinaus konnte an einem Modell der genetisch generierten Epilepsie in CA3-Pyramidenzellen, nach der Abfolge von Aktionspotenzialen, ein vermindertes AHP nachgewiesen werden (Verma-Ahuja et al., 1995). Diese und weitere Arbeiten belegen, dass das AHP maßgeblich mit der Entstehung einer Epilepsie zusammen hängt und in folgenden Untersuchungen weiter betrachtet werden muss.

Obwohl es bereits über zwei Jahrzehnte her ist, seit dem das AHP erstmals beschrieben wurde (Storm, 1987), existieren heute immer noch kontroverse Meinungen über dessen Generierung. Wie eingehend beschrieben, können drei verschiedene Potenzialkomponenten nach ihrer Kinetik unterschieden werden, schnelle (f = engl. fast), mittlere (m = engl. medium) und langsame (s = engl. slow) (Sah, 1996). Zusätzlich zu ihren verschiedenen kinetischen Eigenschaften sind sie auch pharmakologisch voneinander abgrenzbar, da das mAHP im Gegensatz zum sAHP durch das Bientoxin Apamin (einem selektiven SK-Kanal Blocker) eliminierbar ist (Köhler et al., 1996; Stocker et al., 1999). Eine weit verbreitete Ansicht ist, dass das hippokampale mAHP zum größten Teil durch SK-Kanäle verursacht wird (Bond et al., 1999). Zwei vorangegangene Studien können diese

Ergebnisse ebenfalls belegen (Stocker et al., 1999; Stackman et al., 2002). Allerdings existieren offensichtlich auch gegenteilige Belege, die keinen Zusammenhang von SK-Aktivität und der Auslösung von mAHP besitzt (Storm, 1989). Infolgedessen werden auch andere Kaliumkanäle diskutiert (z.B. KCNQ-, HCN-, und BK-Kanäle) und sind aktueller Gegenstand von Studien (Storm, 1989; Williamson and Alger, 1990; Vogalis et al., 2003; Gu et al., 2005; Gu et al., 2007). Eine Untermauerung dieser Studien ist anhand der hier gezeigten Daten nicht möglich. Die Differenzierung des AHP in seine Stromkomponenten war nicht Bestandteil dieser Arbeit und bietet Raum für nachfolgende Untersuchungen.

Vornehmlich wurden die aktuellen Studien an Rattenmodellen der chronischen Epilepsie durchgeführt. An diesem Punkt stellt sich die Frage, welche Mechanismen verantwortlich sind, wenn schon innerhalb kurzer Zeit, nach akuter epileptiformer Aktivität eine Unterdrückung der AHP-Amplitude zu verzeichnen ist. Da dieser Effekt in den dargestellten Versuchen schon nach 10-30 Minuten zu sehen war, sind andere Prozesse, als strukturelle Veränderungen bzw. Expressionsverschiebungen, dafür verantwortlich. In dieser kurzen Zeit kommen Phosphorylierungsprozesse näher in Betracht. Infolge synaptischer Erregung werden dendritische SK-Kanäle aktiviert und führen zu einem hyperpolarisierenden Nachpotenzial. Dieses AHP wird durch auswärtsgerichtete K^+ -Ströme hervorgerufen, die durch den Influx von extrazellulärem Ca^{2+} aktiviert werden (Blatz and Magleby, 1986; Lancaster and Nicoll, 1987; Sah, 1996; Stocker et al., 1999). Ein solcher Ca^{2+} -Influx kann z.B. über dendritische NMDA-Rezeptoren (Kovalchuk et al., 2000) oder spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle erfolgen (Magee et al., 1995; Magee and Johnston, 1995). Die Aktivierung von SK-Kanälen erfolgt jedoch nicht über eine direkte Kalziumbindestelle am Kanalprotein, sondern über Calmodulin, ein kalziumbindendes Protein, welches hier die Schlüsselrolle einnimmt. So existieren spezifische Domänen am SK-Kanal; die Calmodulin-Bindungsdomänen (CaMBD). Kalziumionen binden an die spezifischen Domänen des CaM des SK-Kanals und rufen über den CaM-CaMBD-Komplex eine Konformationsänderung der Kanalpore und somit Aktivierung des SK-Kanals hervor. Diese führt dann zur Repolarisation bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran (Xia et al., 1998; Keen et al., 1999; Schumacher et al., 2001).

Weiterhin besteht die Annahme, dass neben der CaMBD noch weitere Domänen zu finden sind, die durch Kinasen phosphorylierbar sind und so auch für die Modulation der Kanalaktivierung bzw. -inaktivierung zuständig sind (Köhler et al., 1996).

Auch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse am CaM selbst können zu einer Modifikation der Kanalaktivität führen. Vorangegangene Studien haben aufgedeckt, dass die Caseinkinase II (CK2) und Proteinphosphatase 2A (PPA2) eine Veränderung der Kalziumsensitivität des CaM hervorruft und somit die Funktion von SK2-Kanälen herabsetzt. Es wurde gezeigt, dass beide Proteine an der zytoplasmatischen Domäne der SK2-Kanäle binden und die Kanaloffenwahrscheinlichkeit durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Calmodulin beeinflussen. (Bildl et al., 2004; Allen et al., 2007; Maingret et al., 2008). Andere Untersuchungen belegen, dass Phosphorylierungen innerhalb des C-terminalen Endes der SK-Untereinheit durch die Proteinkinase A, eine verminderte Expression in der Zellmembran zur Folge hat (Ren et al., 2006). Auch eine Studie an Pyramidenzellen der Amygdala zeigte, dass Phosphorylierung durch die Proteinkinase A eine Verminderung der Internalisierung in die Plasmamembran zur Folge hat. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass die phosphorylierten Domänen denen der hippokampalen Zellen gleichen, die in CA1 Pyramidenzellen für die Regulation der Langzeitpotenzierung (LTP) verantwortlich sind (Lin et al., 2008).

Die aufgeführten Befunde führen zu der Fragestellung, ob auch nach Induktion akuter epileptiformer Aktivität mit Gabazin Phosphorylierungsvorgänge an der Regulierung der SK-Kanal Aktivität beteiligt sind. Phosphorylierungen und Dephosphorylierung von Zellproteinen, wie Rezeptoren, Kanälen, Transkriptionsfaktoren und Enzymen, stellen in der zellulären Signaltransduktion wichtige Kontrollmechanismen dar (Walaas and Greengard, 1991). Die eigentlichen, grundlegenden Regulationsmechanismen des AHP und neuronaler Erregbarkeit sind noch schlecht verstanden. Einige Studien zeigen, dass einzelne Komponenten des nachhyperpolarisierenden Stromes durch Kinasekaskaden reguliert werden (Madison and Nicoll, 1984; Haug and Storm, 2000). Bekannt ist,

dass direkte Kanalphosphorylierungen neuronale Entladungen regulieren, die Kinetik von Kanälen verändern und Modifizierungen in der Membranintegrität hervorrufen (Jonas and Kaczmarek, 1996). Weiterhin wird angenommen, dass Störungen in der kinasevermittelten Phosphorylierung ätiologische Bedeutung in der Krankheitsentstehung von Formen der Epilepsie haben. In der Tat zeigen Versuche an Knockout-Mäusen, in denen komplett eine Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase 2 (CAMKII) deletiert wurde, eine signifikant gesteigerte neuronale Exzitabilität und Generierung epileptischer Anfälle im limbischen System (Butler et al., 1995). Die hier dargestellten Daten konnten zeigen, dass eine AHP-Suppression nach Applikation des Breitspektrum Proteinkinaseblockers H-9 verhindert werden konnte. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von H-9 schließt insbesondere die Hemmung von Proteinkinase A, C und G (PKA, PKC, PKG), die Calmodulinkinase II (CaMKII) und die Caseinkinase I (CK1) ein. Eine Inhibition der Caseinkinase II erfolgt erst ab Konzentration von 300 μM (Hidaka and Kobayashi, 1992). Dies belegt, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Gabazin-induzierte Suppression des AHP durch Proteinkinasen hervorgerufen wurde, wobei die Caseinkinase II auszuschließen ist.

Als weiteres Schlüsselenzym zur Verminderung der SK2-Aktivität wird in der aktuellen Literatur insbesondere die Proteinkinase A diskutiert. Über direkte Phosphorylierung am Kanal ruft sie die Kanalinternalisierung hervor. Hierdurch kommt es zu einem Rückgang des auswärtsgerichteten Kaliumstromes von SK2 und damit zur Reduktion des AHP (Ren et al., 2006; Lin et al., 2008). Weiterhin konnte belegt werden, dass eine erhöhte Expression von PKA mit Formen von Epilepsie einhergehen können, so dass angenommen werden kann, dass sich auch Funktionsstörungen von SK-Kanälen über diesen Mechanismus erklären können (Yechikhov et al., 2001). Weiterhin berichteten mehrere Arbeitsgruppen, dass Modifizierungen der Phosphorylierungen durch PKA an Glutamatrezeptoren, aber auch GABAerger Transmissionen im Hippokampus ursächlich für epileptiforme Entladungen sein können (Moussa et al., 2001; Niimura et al., 2005; Negrete-Díaz et al., 2006). Nach Vázquez-López et al. geht eine Zunahme an PKA-Aktivität mit erhöhter neuronaler Erregbarkeit einher, so dass die Inhibition

von PKA einen antiepileptischen Effekt herbeiführt (Vázquez-López et al., 2005). In einer Veröffentlichung aus 2008 konnte gezeigt werden, dass nach akut induzierter Epilepsie, die PKA-Aktivität erhöht war (Ristori et al., 2008). Deshalb wurde der spezifischere PKA-Inhibitor H-89 verwendet, um den Einfluss auf das AHP zu untersuchen (Lochner and Moolman, 2006). Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen, dass auch bei diesen Versuchen keine Supprimierung des AHP erfolgte. Das legt die Vermutung nahe, dass das AHP durch Aktivierung von Proteinkinasen unterdrückt wird - wahrscheinlich durch PKA. Anzumerken ist, dass beide Proteinkinaseinhibitoren das Auftreten sowohl der epileptiformen Entladungen, als auch der Membrandepolarisierung nicht verhindern konnten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei diesen elektrophysiologischen Prozessen Kinaseaktivierungen nachgeschaltet sind.

Obwohl H-89 als selektiver PKA-Blocker marktbestimmend ist, konnten Davies und Mitarbeiter im Jahr 2000 zeigen, dass ab einer Konzentration von 10 μM mindestens acht weitere Kinasen blockiert werden (Davies et al., 2000). Hierzu gehören z.B. die S6-Kinase 1, die Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase 1, sowie die Rho-Kinase 2. Insbesondere diese Kinasen konnten mit der gleichen Potenz oder sogar noch einer höheren als für die PKA inhibiert werden (Lochner and Moolman, 2006). Ungeachtet dessen gibt es aktuell keine Studien, die beweisen, dass es einen Zusammenhang zwischen den o.g. Kinasen und SK-Kanälen gibt. So trifft für diese Konstellation mit großer Wahrscheinlichkeit zu, dass die PKA der wichtigste Angriffsort für H-89 ist.

Die Unterdrückung des AHP hängt offenbar ganz wesentlich von der PKA-Aktivierung und wahrscheinlich nachfolgender SK-Internalisierung ab (Ren et al., 2006). Eine Beeinflussung und Veränderung anderer Kanäle (z.B. KCNQ/M) kann allerdings mit den vorliegenden Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Es wurde bereits diskutiert, dass der dem AHP-unterliegende auswärtsgerichtete Kaliumstrom auch durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle generiert werden können (Yue and Yaari, 2004). Der Einfluss der PKA auf spezielle Ankerproteine an KCNQ/M, die funktionellen Interaktionen untereinander, sowie die Auswirkung auf die zelluläre Transmission ist Gegenstand aktueller Forschung (Bal et al.,

2010). Weitere Untersuchungen mit H-89 in Kombination, unter Einsatz von zusätzlichen Proteinkinaseinhibitoren, am hippocampalen Hirnschnitt könnten demnach eine engere Ein- und Abgrenzung bezüglich der Wirkungen von Phosphorylierungsvorgängen möglich machen.

6.5 Zusammenfassung

Eine langanhaltende Depolarisation von hippocampalen CA1 Neuronen induziert eine Abfolge von Aktionspotenzialen, welche von einem deutlichen Nachhyperpolarisationspotenzial gefolgt wird (AHP). In dieser Arbeit wurden unter Zugabe des GABA_A-Rezeptorblockers Gabazin akute epileptiforme Entladungen induziert und ihr Einfluss auf das AHP genauer betrachtet. Dies erfolgte mithilfe simultaner intra- und extrazellulärer Messungen im isolierten Rattenhippocampus. Nach zehnminütiger Einwaschphase von Gabazin traten spontane, epileptiforme Entladungen auf. Diese waren sowohl von einer signifikanten Verschiebung des Membranpotenzials in depolarisierende Richtung, als auch einer Erhöhung des Eingangswiderstandes begleitet. Die Anzahl der Aktionspotenziale unter der verlängerten Depolarisation von 600ms unterschied sich im Vergleich zwischen Gabazin-behandelten und -nativen CA1 Neuronen nicht. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die AHP Amplitude nach 20-minütiger Applikation von Gabazin signifikant gesenkt wurde. Interessanterweise wurde durch Blockierung excitatorischer NMDA- und AMPA-Rezeptoren und sich daraus ergebender Unterdrückung der spontanen, epileptiformen Entladungen mittels additiver Applikation von 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 µM) und D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (D-AP5, 50 µM) eine AHP-Unterdrückung nicht mehr nachgewiesen. Eine AHP-Reduktion konnte auch nach zusätzlicher Applikation der Proteinkinaseblocker H-9 (100µM) und H-89 (1µM) nicht gesehen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das AHP nach Induktion akuter, epileptiformer Entladungen unterdrückt wird und die Ursache in der Aktivierung von Proteinkinasen und Phosphorylierungsvorgänge zu sehen ist, am wahrscheinlichsten hervorgerufen durch die Proteinkinase A. Weitere Studien sind notwendig, um die Mechanismen der PKA-Aktivierung nach akuten, epileptiformen Entladungen zu erforschen.

Diese Arbeit hat Eingang in eine wissenschaftliche Veröffentlichung gefunden: Kernig K, Kirschstein T, Würdemann T, Rohde M, Köhling R (2012) *The afterhyperpolarizing potential following a train of action potentials is suppressed in an acute epilepsy model in the rat Cornu Ammonis 1 area. Neuroscience* 201:288-296.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Hippokampus im Querschnitt (schematisch)	15
Abbildung 4-1: Positionierung der Feld- und Intrazellularelektrode im Stratum radiatum bzw. pyramidale der CA1-Region des isolierten Hippokampus	36
Abbildung 4-2: Intrazelluläre Spannungsmessung mittels Mikroelektrode (schematisch)	37
Abbildung 4-3: Strominjektion und gleichzeitige Spannungsmessung	38
Abbildung 5-1: Auslösung akuter epileptiformer Aktivität	44
Abbildung 5-2: Beeinflussung des Ruhemembranpotenzials (RMP) und Eingangswiderstandes (R_m) durch Gabazin ($5 \mu\text{M}$)	46
Abbildung 5-3: Reduktion des AHP unter Einfluss von Gabazin	48
Abbildung 5-4: Vergrößerung der AHP Amplitude durch Membrandepolarisation	49
Abbildung 5-5: Auslösung epileptischer Aktivität durch Gabazin auch in Anwesenheit von H-9 und H-89	51
Abbildung 5-6: H-9 und H-89 additiv zu Gabazin verhindern eine AHP-Reduktion	53

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: elektrophysiologische Zellparameter der Kontrollpyramidenzelle	43
--	----

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Vor allem danke ich dabei Herrn Univ. Prof. Dr. med. R. Köhling für die Vergabe dieses interessanten Themas und seinem immerwährenden Engagement konstruktiv an der Entwicklung der Ergebnisse mitzuwirken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. T. Kirschstein für seine ausgezeichnete Betreuung und kontinuierliche Unterstützung bei theoretischen und praktischen Problemen, die eine Veröffentlichung dieser Dissertation ermöglichte. Reibungslose Abläufe der Experimente wurden durch tatkräftige Mitarbeit von Frau Dipl.-Chem. Katrin Porath und Frau Dipl.-Biol. Ulrike Mikkat realisiert. In Zusammenarbeit mit Herrn Dip. Biol. Marco Rohde konnte die intrazelluläre Messmethodik perfektioniert werden. Herrn Dr. Tursonjan Tokay danke ich für die vielen Gespräche während der Messungen und auch ein Notstand an ACSF-Lösung konnte das eine oder andere Mal ausgeglichen werden. Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Physiologie für das immer freundliche Arbeitsklima während der Jahre am Institut. Für die unermüdliche Unterstützung und Motivation und dafür, dass er mir stets Mut zugesprochen hat, möchte ich meinem lieben Freund Matthias Schoen von Herzen danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie, ohne deren emotionale und finanzielle Unterstützung mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Die Reduktion des Nachhyperpolarisationspotenzials nach einer Abfolge von Aktionspotenzialen in der CA1 Region im akuten Epilepsiemodell der Ratte“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfen verfasst habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Rostock, den 17.Juli 2014

Karoline Kernig

9 Lebenslauf

Publikationen

Originalarbeiten

Kernig K, Kirschstein T, Würdemann T, Rohde M, Köhling R (2012) The afterhyperpolarizing potential following a train of action potentials is suppressed in an acute epilepsy model in the rat Cornu Ammonis 1 area. Neuroscience 201:288-296.

Laue J, MD; Kernig K, MS; Banz V, MD; Keel M, MD; Schnüriger B Blunt extraperitoneal rectal injury in combination with a pelvic fracture (www.swiss-trauma.ch)

Kongressbeiträge

Kernig K, Kirschstein T, Rohde M, Köhling R GABA_A receptor inhibition reduces the afterhyperpolarizing Potential following a train of action potentials. Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies. (Kopenhagen, Dänemark; 2010)

Kernig K, Kirschstein T, Rohde M, Köhling R The afterhyperpolarizing potential following a train of action potentials is reduced in an acute model of epilepsy via protein kinase activation. Kongress der deutschen physiologischen Gesellschaft. (Regensburg, Deutschland; 2011)

10 Thesen

Thema:

Die Suppression des Nachhyperpolarisationspotenzials nach einer Abfolge von Aktionspotenzialen in der CA1 Region im akuten Epilepsiemodell der Ratte.

1. Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen weltweit.
2. Kongenitale oder erworbene Erkrankungen des Gehirns können eine Epilepsie auslösen.
3. Häufigster Ursprung einer Epilepsie ist der Temporallappen.
4. Ein neuropathologisches Korrelat einer Temporallappenepilepsie stellt die Hippokampussklerose dar.
5. Nach verlängerter Depolarisation und Auslösung von Aktionspotenzialsalven kommt es zu einem Nachhyperpolarisationspotenzial (AHP).
6. Das AHP wirkt hemmend auf die Überleitung vom interiktalen zum iktalen Zustand und wirkt so terminierend auf epileptische Anfälle.
7. Spannungsunabhängige, Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle (SK-Kanäle) sind an der Ausbildung des AHP beteiligt
8. Intrazelluläre in vitro Untersuchungen von hippokampalen CA1 Pyramidenzellen sind erforderlich, um die Auswirkung akuter epileptiformer Aktivität auf das AHP zu untersuchen.
9. Der GABA_A-Rezeptorblocker Gabazin induziert akute epileptiforme Aktivität.

10. Akute epileptiforme Aktivität reduziert die AHP Amplitude signifikant.
11. Hemmung von AMPA- und NMDA-Glutamatrezeptoren hebt akute epileptiforme Aktivität auf und beeinflusst das AHP nicht.
12. Depolarisation alleine vergrößert die AHP Amplitude und lässt darauf schließen, dass diese nur durch Gabazin-induzierte akute epileptiforme Aktivität verringert wurde.
13. Die Proteinkinaseblocker H-9 und H-89 verhindern eine Reduktion des AHP nach Auslösung akuter epileptiformer Aktivität.
14. Proteinphosphorylierung, am wahrscheinlichsten hervorgerufen durch Proteinkinase A, ist verantwortlich für die schnelle Reduktion des AHP nach Induktion akuter epileptiformer Aktivität.

11 Referenzen

- (1981) Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22:489-501.
- (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30:389-399.
- (1993) Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 34:592-596.
- Alger BE, Nicoll RA (1980) Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science* 210:1122-1124.
- Alger BE, Williamson A (1988) A transient calcium-dependent potassium component of the epileptiform burst after-hyperpolarization in rat hippocampus. *J Physiol* 399:191-205.
- Alger BE, Pitler TA, Williamson A (1990) A prolonged post-tetanic hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *Brain Res* 521:118-124.
- Allen D, Fakler B, Maylie J, Adelman JP (2007) Organization and regulation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel multiprotein complexes. *J Neurosci* 27:2369-2376.
- Amaral DG (1993) Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr Opin Neurobiol* 3:225-229.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V (2002) Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* 68:167-207.
- Ayala GF, Dichter M, Gumnit RJ, Matsumoto H, Spencer WA (1973) Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res* 52:1-17.
- Azouz R, Jensen MS, Yaari Y (1996) Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 492 (Pt 1):211-223.

- Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 59:814-824.
- Bal M, Zhang J, Hernandez CC, Zaika O, Shapiro MS (2010) Ca²⁺/calmodulin disrupts AKAP79/150 interactions with KCNQ (M-Type) K⁺ channels. *J Neurosci* 30:2311-2323.
- Baraban JM, Snyder SH, Alger BE (1985) Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: electrophysiological effects of phorbol esters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2538-2542.
- Barbarosie M, Avoli M (1997) CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J Neurosci* 17:9308-9314.
- Bassin S, Smith TL, Bleck TP (2002) Clinical review: status epilepticus. *Crit Care* 6:137-142.
- Behr J, Gloveli T, Heinemann U (2000) Kindling induces a transient suppression of afterhyperpolarization in rat subicular neurons. *Brain Res* 867:259-264.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Bildl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, Knipper M, Mann M, Schulte U, Adelman JP, Fakler B (2004) Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron* 43:847-858.
- Blatz AL, Magleby KL (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323:718-720.
- Blümcke I, Thom M, Wiestler OD (2002) Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12:199-211.
- Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke HJ, Lehmann T, von Deimling A, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstöck J, Stefan H, Hildebrandt M (2007) A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 113:235-244.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:370-378.
- Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, Adelman JP (2004) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel knock-

- out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24:5301-5306.
- Bright DP, Aller MI, Brickley SG (2007) Synaptic release generates a tonic GABA(A) receptor-mediated conductance that modulates burst precision in thalamic relay neurons. *J Neurosci* 27:2560-2569.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA (2002) Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha(4)\beta(3)\delta$ GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 136:965-974.
- Butler LS, Silva AJ, Abeliovich A, Watanabe Y, Tonegawa S, McNamara JO (1995) Limbic epilepsy in transgenic mice carrying a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II α -subunit mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6852-6855.
- Camfield PR, Camfield CS (1996) Antiepileptic drug therapy: when is epilepsy truly intractable? *Epilepsia* 37 Suppl 1:S60-65.
- Campos Rosa J, Galanakis D, Piergentili A, Bhandari K, Ganellin CR, Dunn PM, Jenkinson DH (2000) Synthesis, molecular modeling, and pharmacological testing of bis-quinolinium cyclophanes: potent, non-peptidic blockers of the apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *J Med Chem* 43:420-431.
- Chagnac-Amitai Y, Connors BW (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 61:747-758.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246:435-458.
- Clarke RJ, Johnson JW (2008) Voltage-dependent gating of NR1/2B NMDA receptors. *J Physiol* 586:5727-5741.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B (1999) Molecular diversity of K^{+} channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:233-285.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95-105.
- Debarbieux F, Brunton J, Charpak S (1998) Effect of bicuculline on thalamic activity: a direct blockade of IAHP in reticularis neurons. *J Neurophysiol* 79:2911-2918.
- Ding R, Asada H, Obata K (1998) Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic

- acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid. *Brain Res* 800:105-113.
- Eckstein-Ludwig U, Fei J, Schwarz W (1999) Inhibition of uptake, steady-state currents, and transient charge movements generated by the neuronal GABA transporter by various anticonvulsant drugs. *Br J Pharmacol* 128:92-102.
- Engel J (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 7:340-352.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470-472.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 34:774-780.
- Fritschy JM (2008) Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity. *Front Mol Neurosci* 1:5.
- Galanopoulou AS (2007) Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA(A) receptor signaling by seizures. *Epilepsia* 48 Suppl 5:14-18.
- Gardos G (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30:653-654.
- Glykys J, Mody I (2007) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 582:1163-1178.
- Grunnet M, Jensen BS, Olesen SP, Klaerke DA (2001) Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Pflugers Arch* 441:544-550.
- Gu N, Vervaeke K, Storm JF (2007) BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 580:859-882.

- Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium afterhyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 566:689-715.
- Gustafsson B, Wigström H (1981) Evidence for two types of afterhyperpolarization in CA1 pyramidal cells in the hippocampus. *Brain Res* 206:462-468.
- Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW (2006) Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26:1844-1853.
- Haug T, Storm JF (2000) Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca²⁺-dependent K⁺ current, I(sAHP), by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:2071-2079.
- Hesdorffer DC, Logroscino G, Benn EK, Katri N, Cascino G, Hauser WA (2011) Estimating risk for developing epilepsy: a population-based study in Rochester, Minnesota. *Neurology* 76:23-27.
- Hevers W, Lüddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18:35-86.
- Hidaka H, Kobayashi R (1992) Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:377-397.
- Hotson JR, Prince DA (1980) A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 43:409-419.
- Hougaard C, Eriksen BL, Jørgensen S, Johansen TH, Dyhring T, Madsen LS, Strøbaek D, Christophersen P (2007) Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 151:655-665.
- Houser CR, Esclapez M (2003) Downregulation of the alpha5 subunit of the GABA(A) receptor in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 13:633-645.
- Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11651-11656.
- Ito Y, Koshiba T, Doi M, Asami S, Fukuda H, Murakoshi Y (1992) Characterization of antagonistic activity and binding properties of SR 95531, a pyridazinyl-GABA derivative, in rat brain and cultured cerebellar neuronal cells. *Synapse* 10:326-333.

- Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N (2008) Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506:535-547.
- Jensen MS, Azouz R, Yaari Y (1994) Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J Neurophysiol* 71:831-839.
- Jensen MS, Azouz R, Yaari Y (1996) Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 492 (Pt 1):199-210.
- Johnson SW, Seutin V (1997) Bicuculline methiodide potentiates NMDA-dependent burst firing in rat dopamine neurons by blocking apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} currents. *Neurosci Lett* 231:13-16.
- Joiner WJ, Wang LY, Tang MD, Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11013-11018.
- Jonas EA, Kaczmarek LK (1996) Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr Opin Neurobiol* 6:318-323.
- Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, Maylie J (1999) Domains responsible for constitutive and Ca^{2+} -dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca^{2+} -activated potassium channels. *J Neurosci* 19:8830-8838.
- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J (1999) Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438:314-321.
- Kirschstein T (2009) Untersuchungen zur hippocampalen synaptischen Plastizität und Metaplastizität im Pilokarpinmodell der Temporallappenepilepsie. In: Rostock.
- Kittler JT, McAinsh K, Moss SJ (2002) Mechanisms of GABAA receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* 26:251-268.
- Klein M, Shapiro E, Kandel ER (1980) Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current. *J Exp Biol* 89:117-157.
- Kovalchuk Y, Eilers J, Lisman J, Konnerth A (2000) NMDA receptor-mediated subthreshold Ca^{2+} signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:1791-1799.

- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charkov S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10058-10063.
- Krahe R, Gabbiani F (2004) Burst firing in sensory systems. *Nat Rev Neurosci* 5:13-23.
- Kuntz A, Clement HW, Lehnert W, van Calcar D, Hennighausen K, Gerlach M, Schulz E (2004) Effects of secretin on extracellular amino acid concentrations in rat hippocampus. *J Neural Transm* 111:931-939.
- Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Lancaster B, Nicoll RA (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 389:187-203.
- Lappin SC, Dale TJ, Brown JT, Trezise DJ, Davies CH (2005) Activation of SK channels inhibits epileptiform bursting in hippocampal CA3 neurons. *Brain Res* 1065:37-46.
- Leppik IE (1992) Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Res Suppl* 5:7-11.
- Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res* 384:145-155.
- Lin MT, Luján R, Watanabe M, Adelman JP, Maylie J (2008) SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 11:170-177.
- Lochner A, Moolman JA (2006) The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 24:261-274.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH (1990) Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70:453-511.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL (1999) It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* 40:120-122.
- Löscher W (2002) Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 50:105-123.

- MacLean PD (1952) Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 4:407-418.
- Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354:319-331.
- Magee JC, Johnston D (1995) Synaptic activation of voltage-gated channels in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Science* 268:301-304.
- Magee JC, Christofi G, Miyakawa H, Christie B, Lasser-Ross N, Johnston D (1995) Subthreshold synaptic activation of voltage-gated Ca^{2+} channels mediates a localized Ca^{2+} influx into the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 74:1335-1342.
- Maingret F, Coste B, Hao J, Giamarchi A, Allen D, Crest M, Litchfield DW, Adelman JP, Delmas P (2008) Neurotransmitter modulation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by regulation of Ca^{2+} gating. *Neuron* 59:439-449.
- Masukawa LM, Benardo LS, Prince DA (1982) Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Res* 242:341-344.
- Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK (1997) Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:199-212.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK (1995) The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 118 (Pt 1):105-118.
- Matsumoto H, Ajmone Marsan C (1964) CELLULAR MECHANISMS IN EXPERIMENTAL EPILEPTIC SEIZURES. *Science* 144:193-194.
- Matsumoto H, Ayala GF, Gumnit RJ (1969) Neuronal behavior and triggering mechanism in cortical epileptic focus. *J Neurophysiol* 32:688-703.
- Meech RW (1972) Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 42:493-499.
- Meech RW, Standen NB (1975) Potassium activation in *Helix aspersa* neurones under voltage clamp: a component mediated by calcium influx. *J Physiol* 249:211-239.
- Meldrum BS, Horton RW (1973) Physiology of status epilepticus in primates. *Arch Neurol* 28:1-9.

- Mody I (2001) Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem Res* 26:907-913.
- Moussa RC, Ikeda-Douglas CJ, Thakur V, Milgram NW, Gurd JW (2001) Seizure activity results in increased tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 95:36-47.
- Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Delgado-García JM, Rodríguez-Moreno A (2006) Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol* 96:1829-1837.
- Nevander G, Ingvar M, Auer R, Siesjö BK (1985) Status epilepticus in well-oxygenated rats causes neuronal necrosis. *Ann Neurol* 18:281-290.
- Niimura M, Moussa R, Bissoon N, Ikeda-Douglas C, Milgram NW, Gurd JW (2005) Changes in phosphorylation of the NMDA receptor in the rat hippocampus induced by status epilepticus. *J Neurochem* 92:1377-1385.
- Overstreet LS, Westbrook GL (2001) Paradoxical reduction of synaptic inhibition by vigabatrin. *J Neurophysiol* 86:596-603.
- Oxbury JM, Whitty CW (1971) Causes and consequences of status epilepticus in adults. A study of 86 cases. *Brain* 94:733-744.
- Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. In, pp 725-733. *Archive of Neurological Psychiatry*.
- Pedarzani P, D'hoedt D, Doorty KB, Wadsworth JD, Joseph JS, Jeyaseelan K, Kini RM, Gadre SV, Sapatnekar SM, Stocker M, Strong PN (2002) Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J Biol Chem* 277:46101-46109.
- Pegoraro S, Broccard FD, Ruaro ME, Bianchini D, Avossa D, Pastore G, Bisson G, Altafini C, Torre V (2010) Sequential steps underlying neuronal plasticity induced by a transient exposure to gabazine. *J Cell Physiol* 222:713-728.
- Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR (2004) Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 24:8629-8639.
- Perucca E (2005) An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia* 46 Suppl 4:31-37.
- Pike FG, Meredith RM, Olding AW, Paulsen O (1999) Rapid report: postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J Physiol* 518 (Pt 2):571-576.

- Ren Y, Barnwell LF, Alexander JC, Lubin FD, Adelman JP, Pfaffinger PJ, Schrader LA, Anderson AE (2006) Regulation of surface localization of the small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281:11769-11779.
- Ristori C, Cammalleri M, Martini D, Pavan B, Liu Y, Casini G, Dal Monte M, Bagnoli P (2008) Involvement of the cAMP-dependent pathway in the reduction of epileptiform bursting caused by somatostatin in the mouse hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378:563-577.
- Romey G, Hugues M, Schmid-Antomarchi H, Lazdunski M (1984) Apamin: a specific toxin to study a class of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. *J Physiol (Paris)* 79:259-264.
- Rossi DJ, Hamann M, Attwell D (2003) Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 548:97-110.
- Sah P (1996) Ca^{2+} -activated K^{+} currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19:150-154.
- Sander JW (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 16:165-170.
- Schulz R, Kirschstein T, Brehme H, Porath K, Mikkat U, Köhling R (2012) Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channel-mediated AHP currents. *Neurobiol Dis* 45:337-347.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bächinger HP, Adelman JP (2001) Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin. *Nature* 410:1120-1124.
- Schwartzkroin PA, Stafstrom CE (1980) Effects of EGTA on the calcium-activated afterhyperpolarization in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Science* 210:1125-1126.
- Schwartzkroin PA, Prince DA (1980) Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain Res* 183:61-76.
- Seutin V, Scuvée-Moreau J, Dresse A (1997) Evidence for a non-GABAergic action of quaternary salts of bicuculline on dopaminergic neurones. *Neuropharmacology* 36:1653-1657.
- Shakkottai VG, Regaya I, Wulff H, Fajloun Z, Tomita H, Fathallah M, Cahalan MD, Gargus JJ, Sabatier JM, Chandy KG (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K^{+} channel, SkCa2. *J Biol Chem* 276:43145-43151.

- Shao LR, Halvorsrud R, Borg-Graham L, Storm JF (1999) The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 521 Pt 1:135-146.
- Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T (2002) Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci* 22:10163-10171.
- Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N (2000) Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84:2398-2408.
- Stell BM, Mody I (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:RC223.
- Stocker M, Pedarzani P (2000) Differential distribution of three Ca^{2+} -activated K^{+} channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 15:476-493.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P (1999) An apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4662-4667.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733-759.
- Storm JF (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 409:171-190.
- Storm JF (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* 83:161-187.
- Strøbaek D, Jørgensen TD, Christophersen P, Ahring PK, Olesen SP (2000) Pharmacological characterization of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels stably expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 129:991-999.
- Theodore WH, Porter RJ, Albert P, Kelley K, Bromfield E, Devinsky O, Sato S (1994) The secondarily generalized tonic-clonic seizure: a videotape analysis. *Neurology* 44:1403-1407.
- Tossman U, Ungerstedt U (1986) Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 128:9-14.
- Treiman DM (2001) GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3:8-12.

- Uchida I, Cestari IN, Yang J (1996) The differential antagonism by bicuculline and SR95531 of pentobarbitone-induced currents in cultured hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* 307:89-96.
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998) Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:321-329.
- Verma-Ahuja S, Evans MS, Pencek TL (1995) Evidence for decreased calcium dependent potassium conductance in hippocampal CA3 neurons of genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Res* 22:137-144.
- Vogalis F, Storm JF, Lancaster B (2003) SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci* 18:3155-3166.
- Vázquez-López A, Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G (2005) Role of cAMP-dependent protein kinase on acute picrotoxin-induced seizures. *Neurochem Res* 30:613-618.
- Walaas SI, Greengard P (1991) Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol Rev* 43:299-349.
- Walker MC, White HS, Sander JW (2002) Disease modification in partial epilepsy. *Brain* 125:1937-1950.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M, Group EaEoSfTLES (2001) A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 345:311-318.
- Wieser HG (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45:695-714.
- Williamson A, Alger BE (1990) Characterization of an early afterhyperpolarization after a brief train of action potentials in rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurophysiol* 63:72-81.
- Williamson R, Wheal HV (1992) The contribution of AMPA and NMDA receptors to graded bursting activity in the hippocampal CA1 region in an acute in vitro model of epilepsy. *Epilepsy Res* 12:179-188.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.

- Yechikhov S, Morenkov E, Chulanova T, Godukhin O, Shchipakina T (2001) Involvement of cAMP- and Ca(2+)/calmodulin-dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition to audiogenic seizures in rats. *Epilepsy Res* 46:15-25.
- Yue C, Yaari Y (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:4614-4624.